



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Química

**Estudio fitoquímico del aceite esencial de la *Aloysia*
alaysioides Loes & Moldenke y su evaluación de la
actividad antibacteriana y antifúngica**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Química

AUTOR

Carmen Rosa HUANCA MIRANDA

ASESOR

Dr. Olivio Nino CASTRO MANDUJANO

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huanca, C. (2021). *Estudio fitoquímico del aceite esencial de la Aloysia aloysioides Loes & Moldenke y su evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Química]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Carmen Rosa Huanca Miranda
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44128777
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0638-0190
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Olivio Nino Castro Mandujano
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07683880
URL de ORCID	http://orcid.org/0000-0002-6592-6934
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	José Luis López Gabriel
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08149594
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Juana María Huamán Malla
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25603015
Datos de investigación	
Línea de investigación	C.0.1.1.Productos Naturales
Grupo de investigación	AGROBIOTEC
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA FQIQ-UNMSM Av. República de Venezuela s/n, Cercado de Lima 15081

	Latitud: -12.060 Longitud: -77.083
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Marzo 2019 - octubre 2020
URL de disciplinas OCDE	1.04.01 -- Química orgánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1
“Año del Bicentenario del Perú: 200 Años de Independencia”

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia del **Quím. José Luis López Gabriel** (Presidente), la **Quím. Juana María Huamán Malla** (Miembro) y el **Dr. Olivio Nino Castro Mandujano** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada “**Estudio fitoquímico del aceite esencial de la *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke y su evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica**” después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por la Bachiller en Química: **Carmen Rosa Huanca Miranda**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL** de **QUÍMICA**, acordaron calificarla con la **NOTA** de:

Diecinueve

(LETRA)

19

(NÚMERO)

Ciudad Universitaria, 06 de octubre de 2021.

Quím. JUANA MARÍA HUAMÁN MALLA
MIEMBRO

Quím. JOSÉ LUIS LÓPEZ GABRIEL
PRESIDENTE

Dr. OLIVIO NINO CASTRO MANDUJANO
ASESOR



Firmado digitalmente por SANTIAGO
CONTRERAS Julio Cesar FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 12.10.2021 22:11:59 -05:00

Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS
Director de la E.P. de Química

DEDICATORIA

A mis padres, Gregoria y Wilbert, por enseñarme el camino correcto, su continua comprensión, apoyo incondicional y ser mi fuerza.

A mi hermano Vasco por ser inspiración y orgullo.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer ,a la querida universidad Nacional Mayor De San Marcos donde realice mis estudios profesionales, así como a todos los profesores que contribuyeron significativamente en mi proceso de formación Químico.

Deseo expresar un agradecimiento muy especial a mi asesor de tesis , Mag. Olivio Nino Castro Mandujano: ¡Gracias por su tiempo, dedicación y su apoyo en ella realización de este trabajo de investigación , sobre todo por motivarme con su historia de su tesis de pregrado! De igual manera, agradezco a los miembros del jurado la Químico Juana Huamán y al Químico José Luis López Gabriel, por el esfuerzo y el tiempo dedicado a la revisión de esta investigación.

Al Dr. Jesús Rodilla, por su apoyo con el análisis GS-MS, al Dr. Nelson Bautista por su apoyo en el análisis Antimicrobiano y a Gianella Neves por su tiempo e infinita ayuda en con los análisis IR y UV.

Además quiero dar un agradecimiento especial al profesor Joaquín Sánchez, por su apoyo en la edición y revisión de este trabajo de investigación.

A Emilio Huamán, por su ayuda con el muestreo y recolección, por hacernos recordar lo importante de las tradiciones de la familia y al pueblo del Tintay, muchas gracias

Agradezco a Tania de la Cruz por transmitirme sus conocimientos, el amor por la química, por la formación que me brindo. Eres y serás una de mis mayores inspiraciones, fuiste de las mejores jefas que he tenido y ahora mi colega.

A Henry, mi mejor amigo gracias por acompañarme, por escucharme cientos de veces y estar siempre allí.

Juane por esas largas charlas en la facultad, por su amistad y alentarme a cumplir esta meta. A mis tíos Wilder y Williams por tenerme paciencia gracias.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación describe el estudio fitoquímico del extracto etanólico *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, la extracción de aceite esencial y la identificación de los metabolitos secundarios presentes, validará su actividad antibacteriana. La muestra fue recolectada en el distrito de Tintay, provincia de Aymaraes, en el departamento de Apurímac. De la muestra fresca 673.84 gramos y se realizó la extracción el aceite esencial por destilación por arrastre con vapor de un rendimiento del 0.38% de aceite esencial, el análisis físico y químico del aceite esencial muestra un líquido de color ligeramente amarillo, olor aromático, sabor ligeramente dulce, soluble en etanol absoluto ACS al 96% (insoluble en cloroformo y hexano), con índice de refracción de 1.4799, una densidad de 0.8525 g/mL y un pH cercano a 5. El extracto etanólico fue obtenido a partir 623 gramos de muestra pulverizada, esta incluye las hojas y ramas, se colocaron en 3 litros de etanol al 96%, se realizó una marcha fitoquímica la cual evidencio la presencia polifenoles como taninos y cumarinas.

De la Espectroscopía infrarroja (IR) se muestra que el aceite esencial de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, presenta moléculas en su composición corresponden a estructuras con grupos funcionales: isopropil, metil, metilenos, y carbonilos, los cuales son característicos, aromáticos, compuestos cíclicos, de alcoholes, cetonas y ésteres.

Luego, se identificó sus componentes del aceite esencial por un análisis cromatográfica CG-MS, donde los principales componentes del aceite esencial identificados

fueron: β -Cariofileno (10.88 %), limonelo (9.9 %), p-cimeno (7,22%), Oxido de cariofileno (5.98 %), Nerolidol (4.96 %) y α -humuleno (4.92 %), Finalmente, se realizò ensayos donde se evaluò la actividad antibacteriana individualmente contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando métodos de difusión en disco de agar y dilución en agar, mostrando actividad contra *Staphylococcus aureus* con la formación halo de inhibición de 19 mm un valor aceptable y relativamente cercano al del reportado con la gentamicina .

Palabras claves: *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, actividad antibacteriana, CG-MS.

ABSTRACT

The present research work will describe the phytochemical study of the ethanolic extract *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, the extraction of essential oil and the identification of the secondary metabolites present, will validate its antibacterial activity. The sample was collected in the district of Tintay, province of Aymaraes, in the department of Apurimac. From a fresh sample 673.84 grams and the essential oil was extracted by steam distillation with a yield of 0.38% of essential oil, the physical and chemical analysis of the essential oil indicates that it is a liquid of slightly yellow color, aromatic odor, slightly sweet flavor, soluble in absolute ethanol ACS at 96% (insoluble in chloroform and hexane), with a refractive index of 1.4799, a density of 0.8525 g/mL and a pH close to 5. The ethanolic extract was made from 623 grams of samples including leaves and branches in 3 liters of 96% ethanol, a phytochemical march was performed which showed the presence of polyphenols such as tannins and coumarins.

Infrared spectroscopy (IR) shows that the essential oil of *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, presents molecules in its composition correspond to structures with functional groups: isopropyl, methyl, methylene's, and carbonyls, which are characteristic, aromatic, cyclic compounds, alcohols, ketones, and esters. In the ultraviolet spectroscopy (UV - VIS) shows a peak a band of maximum adsorption in the spectrum at 280 nm, attributed to the presence of organic chromophores as conjugated double bonds and / or aliphatic carbonyls and aromatic rings.

Then, its components of the essential oil were identified by GC-MS chromatographic analysis, where the main components of the essential oil identified were: β -Caryophyllene (10.88 %), limonellum (9.9 %), p-cymene (7.22%), caryophyllene oxide (5.98 %), Nerolidol (4.96 %) and α -humulene (4. Finally, tests were carried out to evaluate the antibacterial activity individually against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* using agar disk diffusion and agar dilution methods, showing activity against *Staphylococcus aureus* with the formation of inhibition halo of 19 mm, an acceptable value and relatively close to that reported with gentamicin.

Key words: *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, antibacterial activity, GC-MS.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	X
Índice de tablas	XI
Índice de anexos.....	XII
Lista	de
abreviaturas	XIII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. Planteamiento del problema	21
1.1.1. Identificación del Problema.....	21
1.1.1. Justificación.....	21
1.2. Objetivos	22
1.2.1. Objetivo General.....	22
1.2.2. Objetivos Específicos	22
1.3. Hipótesis.....	23
1.4. Contribución e impacto	23
1.5. Antecedentes	24
2. CAPÍTULO II: PARTE TEÓRICA	27
2.1. Familia <i>VERBENACEA</i>	27
2.1.1. Género <i>Aloysia</i>	27
2.1.2. Usos y aplicaciones etnomedicinales de las <i>VERVENACEAS</i>	28

2.2.	Aceites esenciales.....	29
2.2.1.	Concepto.....	29
2.2.2.	Clasificación de los aceites esenciales.....	29
2.2.3.	Composición química	30
2.2.4.	Elementos que afectan la calidad de los aceites esenciales.....	32
2.2.5.	Usos y Aplicaciones de los aceites esenciales.....	32
2.2.6.	Obtención de aceites esenciales.....	33
	2.2.6.1. Destilación por arrastre con vapor de agua	33
2.3.	Caracterización organoléptica y fisicoquímica de Aceites.....	34
2.3.1.	Análisis organoléptico	34
2.3.2.	Rendimiento de Aceite esencial.....	34
2.3.3.	Densidad Aceite esencial.....	35
2.3.4.	Solubilidad en etanol	35
2.3.4.	Índice de refracción	35
2.3.4.	pH	36
2.4.	Análisis espectroscópico	37
2.4.1.	Espectro infrarrojo (IR)	37
2.5.	Separación e Identificación de metabolitos secundarios presentes en AE....	38
2.5.1.	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	38
2.6.	Evaluación Antibacteriana	38
2.6.1.	Medición de halos de inhibición.....	38

2.6.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	39
2.6.3.	Infecciones causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.	CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	41
3.1.	Materiales, Reactivos y equipos.....	41
3.1.1.	Materiales	41
3.1.2.	Reactivos	41
3.1.3.	Equipos	41
3.2.	Análisis preliminar	42
3.2.1.	Recolección	42
3.2.2.	Secado y molienda.....	42
3.2.3.	Obtención de extracto Etanólico.....	42
3.3.	Marcha fitoquímica	42
3.4.	Extracción de aceite esencial.....	43
3.4.1.	Preparación de la Materia Vegetal.....	43
3.4.2.	Extracción de aceite esencial por arrastre de vapor.....	45
3.5.	Evaluación Organoléptica y fisicoquímica	45
3.5.1.	Análisis organoléptico	45
3.5.2.	Determinación del rendimiento de Aceite esencial en peso	46
3.5.3.	Determinación de la densidad de Aceite esencial.....	45
3.5.4.	Solubilidad en etanol	47
3.5.5.	Índice de refracción	47

3.5.6.	pH	48
3.6.	Métodos espectroscópicos.....	48
3.6.1.	Espectro infrarrojo (IR)	48
3.7.	Separación e identificación	48
3.7.1.	Cromatografía de gases (GC)	48
3.7.2.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)..	49
3.8.	Análisis microbiológico	49
3.8.1.	Cepas microbianas.....	49
3.8.2.	Preparación de inóculos y ensayo de actividad antimicrobiana	50
4.	CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
4.1.	Recolección y muestreo	51
4.2.	Taxonomía y características <i>botánicas Aloysia aloysioides loes & Moldenke</i>	54
4.3.	Usos y aplicaciones etnomedicinal.....	55
4.4.	Marcha fitoquímica	¡Error! Marcador no definido.
4.5.	Aceite esencial.....	58
4.5.1.	Evaluación Organoléptica y fisicoquímica.....	¡Error! Marcador no definido.
4.5.2.	Análisis espectroscópico.....	63
4.5.2.1.	Espectro infrarrojo (IR)...	63
4.5.3.	Resultados del análisis cromatográfico CG-MS.....	67
4.5.3.1.	β -	

	Cariofileno.....	72
	4.5.3.2. 4.5.3.2.	
	Limoneno.....	73
	4.5.3.3. otros componentes presentes en el aceite esencial.....	41
4.6.	Actividad antibacteriana.....	76
5.	CAPITULO IV: CONCLUSIONES	79
5.1.	Recomendaciones.....	80
7.	CAPITULO V: ANEXOS.....	81
6.	CAPITULO VI: BIBLIOGRAFIA	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: La familia Verbenáceas y su distribución mundial (Heywood, 1985)	28
Figura 2: Destilador por arrastre de vapor a escala.....	35
Figura 3: Espectro IR y ubicación de las regiones en una muestra de isopentano, la región de la huella dactilar (derecha) y la región de las frecuencias de grupo (izquierda), Skoog et al. (2018).	39
Figura 4: Simulación de la formación de halos de inhibición en una muestra	41
Figura 5: Diagrama de flujo de la obtención y caracterización del aceite esencial de <i>Aloysia aloysioides</i> Loes & Moldenke.....	46
Figura 6: Localización del punto de muestreo.....	55
Figura 7: Quebrada de Tajona- TINTAY.	55
Figura 8: Fotografías Muestreo de Lima-lima.	56
Figura 9: <i>Aloysia aloysioides</i> Loes & Moldenke.....	58
Figura 10: Identificación de Taninos	60
Figura 11: Reacción flavonoide en NaOH.....	60
Figura 12: Reacción de identificación de cumarinas fijas.	60
Figura 13: Determinación de pH del AE.	66
Figura 14: Espectro Ir del AE, <i>Aloysia Aloysioides</i> Loes & Moldenke.....	68
Figura 16: Cromatograma GC-MS aceite esencial de <i>Aloysia aloysioides</i> Loes & Moldenke.	72
Figura 17: Porcentaje de Terpenos.....	74
Figura 18: Hidrocarburos presentes en el AE.	75

Figura 19 Molécula β -cariofileno.....	75
Figura 20 Molécula de acetato de Limonelo.....	75
Figura 21 Molécula de p-cimeno	75
Figura 22 Molécula de Sabineno.....	75
Figura 23 Molécula de Oxido de cariofileno	75
Figura 24: Espectros de masa de los componentes mayoritarios.....	76
Figura 25: fragmentación de β -cariofileno obtenido con el GS-MS.....	77
Figura 26: Estructura química del β -cariofileno (4,11,11-trimetil-8-metilen-biciclo [7.2.0] undec-4-eno).....	77
Figura 27: Fragmentación de limoneno obtenido en el GS-MS	78
Figura 28: Isómeros ópticos del limoneno.....	79
Figura 29: Composición de otras Aloysias.	80
Figura 30: Comparación de Limonelo y B. cariofileno en otras Aloysias.....	80
Figura 31: Porcentaje de inhibición de AE comparado con la gentamicina	82
Figura 32: Documento entregado por el museo de Historia Natural.	87
Figura 33: Muestra pulverizada	88
Figura 34: Equipo utilizado en la molienda	88
Figura 35: Identificación de Taninos Flavónicos.....	88
Figura 36: Extracto Etanolico.	88
Figura 37: Identificación de Flavonas, Xantonas y Flavonoides.	89
Figura 38: Identificación de Alcaloides.....	89
Figura 39: Equipo semiindustrial de Extracción por arrastre de vapor.....	90
Figura 40: Recepción en tubo de florentino del AE.....	90
Figura 41: 1ra Medición Índice de refracción.....	91
Figura 42: 2da Medición Índice de refracción.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Nombres populares y usos de Verbenácea medicinales.....	29
Tabla 2: Moléculas constituyentes y sus grupos funcionales.....	32
Tabla 3 Relación densidad y índice de refacción en aceites esenciales	37
Tabla 4 Muestreo de material vegetal	57
Tabla 5: Resultados de la marcha fitoquímica	62
Tabla 6: Características organolépticas teóricas y experimentales del Aceite esencial	63
Tabla 7: RAE % En diferentes especies de VERBENACEAS.....	64
Tabla 8: Condiciones de extracción de AE.....	64
Tabla 9 Densidad Absoluta del Aloysia Aloysioides Loes & Moldenke.....	65
Tabla 10: Determinación de la Densidad mediante Picnometría de 1 mL a 25° C del aceite de las hojas de Aloysia Aloysiodes Loes & Moldenke.....	65
Tabla 11: Solubilidad de AE.....	66
Tabla 12: Índice de refracción Aceite esencial de Aloysia aloysioides Loes & Moldenke a una temperatura de 20.1°C.....	67
Tabla 13: Índice de refracción en <i>VERVENACEAS</i>	67
Tabla 14: Bandas de absorción y estructuras orgánicas del espectro infrarrojo (IR) del aceite esencial de lima-lima.....	70
Tabla 15: La composición del aceite esencial.....	73
Tabla 16: actividad antibacteriana del aceite esencial de la Aloysia aloysioides Loes & Moldenke contra cepas de referencia	81

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Marcha fitoquímica en Extracto Etanolico.	86
Anexo 2: Identificación taxonómica de la Aloysia aloysioides Loes & Moldenke.....	87
Anexo 3: Extracción Aceite esencial del aceite esencial de Aloysia aloysioides Loes & Moldenke “lima”	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>The American Type Culture Collection</i>
<i>Aloysia Peruviana</i>	<i>Aloysia aloysioides Loes & Moldenke</i>
°C	Grado's Celsius
Cm	Centímetro
EE	Extracto Etanólico
G	gramo
GC	Cromatografía de Gases
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
L	Litro
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
EtOH	Metanol
NPH	No presenta halo de inhibición
Pp	Precipitado
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
cm ⁻¹	Ciclos por centímetro
IR	Infrarrojo(a)
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se tiene amplio conocimiento y tradicionalmente utilizada en muchos lugares como un tratamiento medicinal, de las varias especies de la familia VERBENACEAE se sabe que pueden ser usadas para contrarrestar problemas del músculo esquelético, tracto digestivo, para tratar padecimientos de piel y aparato urinario (López-Villafranco *et. al*, 2017).

Por otro lado, la OMS informó que en el 2017 existe un crecimiento del número de patógenos, muchos de ellos multirresistente, los escasos tratamientos y el efecto secundarios de los antibióticos en la salud², proponen nuevas opciones, la familia VERBENACEAE ha demostrado en estudios previos su gran capacidad antimicrobiana, antifúngica, antioxidante y antiinflamatoria esto a partir de extractos acuosos y alcohólicos (Aguado *et. al*, 2013), mediante cromatogramas provenientes de las infusiones de las hojas se establecieron perfiles cromatográficos los cuales fueron caracterizados por la presencia de ácido cafeico y flavonoides (Pereira *et. al*, 2007, Ricco *et. al*, 2010) incluso con actividad contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (Shafiee *et. al*, 2016) Las especies del género *Aloysia* tiene actividad farmacológica, así, como agentes antimicóticos, los aceites esenciales *Aloysia Gratissima* y *Cordia* VERBENÁCEA inhiben la germinación de las esporas de *P. pachyrhizi* (Costa da Silva *et. al*, 2014). Reducen el progreso de la roya asiática de la soja; poseen actividad antimicrobiana Rojas en el 2012 demostró que el aceite esencial de la *Aloysia Triphylla* demostró sus efectos sobre el *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas), otro estudio demostró la eficacia del aceite esencial contra patógenos genito-uritarios y hacen

notable su uso con bajas dosis efectivo contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteos* e inhibición de la inflamación (Pérez *et. al*, 2018).

En el presente trabajo se investigó a la planta *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, para ello se realizó una búsqueda bibliográfica de sus antecedentes para ver las investigaciones realizadas en el género, ya que de la especie en estudio no hay ningún estudio fitoquímico.

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. Identificación del problema

En la actualidad los antibióticos son principalmente de uso médico, este uso y el abuso de los antibióticos está produciendo generaciones de bacterias resistentes, causando que las infecciones se agraven y el paciente no se cure, información publicada por la OMS (2017) ,dan muestra que tanto *el Staphylococcus Aureus* y *E. Coli* son bacterias responsables de muchas infecciones hospitalarias.

Una de las maneras de consumir de antibióticos de forma indirecta es a través del consumo de alimentos tratados previamente con antibióticos, la FDA entre el 2018 y 2019 advirtió la presencia de bacterias en muchos alimentos de consumo diario como en cereales, así como el uso indiscriminado de antibióticos sintéticos por la industria alimentaria, es por ello que ha venido implementado una serie de normas alimentarias que restringen el uso de estos compuestos sintéticos, así como también contempla uso de otras alternativas antibacterianas sin efectos secundarios a largo plazo entre ellos el uso de aceites esenciales.

1.1.1. Justificación.

Motivados por el incremento de muchos patógenos en algunos casos multirresistentes, pretendemos crear una alternativa y/o terapia complementaria frente a estos microorganismos, para ser aplicada en los alimentos. Este estudio realizara una evaluación de los efectos antibacterianos y antifúngicos del aceite esencial del *Aloysia aloysioides Loes & Moldenke* .

Por último, busca crear conciencia y conocimiento de nuestras especies, que va desde las propias autoridades, hasta los nuevos pobladores ya que es actualmente es depredada por la ampliación de la frontera agrícola.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Extraer y caracterizar al aceite esencial de la *Aloysia Aloysioides Loes & Moldenke* y evaluar la actividad antibacteriana.

1.2.1. Objetivo Especifico

- Realizar una marcha fitoquímica del extracto alcohólico de las hojas de la *Aloysia Aloysioides Loes & Moldenke*.
- Obtener el aceite esencial recolectar las hojas y ramas de *Aloysia aloysioides Loes & Moldenke*.
- Evaluar las propiedades físicas del aceite esencial de *Aloysia aloysioides Loes & Moldenke*, realizar una evaluación sensorial, determinar el índice de refracción, solubilidad en alcohol y densidad.
- Identificar los componentes del aceite esencial por cromatografía CG-MS.
- Estudiar las propiedades químicas del aceite esencial *Aloysia aloysioides Loes & Moldenke*, mediante espectroscopía infrarroja.
- Evaluar la actividad antifúngica-antimicrobiana del aceite esencial.

1.3 Hipótesis

El aceite esencial de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke presentará actividad antibacteriana y antifúngica (ya que su composición química incluiría terpenos como limoneno y el citral); además podrá ser aplicado en el campo de los alimentos y; por consiguiente, mejorar la calidad de los alimentos.

1.4 Contribución e impacto.

Nueva alternativa terapéutica o complementaria frente a patógenos presentes en los alimentos, demostrando su capacidad fitosanitaria mediante procedimientos eco sostenibles, contribuir con el respeto al medio ambiente y la conservación de la biodiversidad.

1.5. Antecedentes

Las plantas medicinales representan la fuente más importante de recursos para el tratamiento de diferentes enfermedades de los usuarios tradicionales (Morón F. 2008). Aunque los avances tecnológicos, científicos y la síntesis orgánica han avanzado enormemente, pero en estos últimos años, los consumidores han percibido que los compuestos naturales pueden llegar a ser incluso inocuos y este consumo va en aumento, lo que ha dado paso a un desarrollo importante de la agroindustria de plantas aromáticas y medicinales a nivel mundial (Gallegos- Zurita M. 2016).

La familia *VERBENACEAE* contiene alrededor de 100 géneros con unas 2000 especies distribuidas en muchas regiones del hemisferio sur las cuales van desde zonas templadas, tropicales hasta subtropicales, generalmente son plantas leñosas pueden presentar arbustos altos o bajos, la gran mayoría son aromáticos y con flores fragantes según Steibel (2000). Estudios previos han permitido evidenciar su utilidad en la medicina tradicional contra malestares del aparato reproductor femenino, aparato digestivo, musculo esquelético y nosologías dependientes de la cultura¹, como antioxidantes, esto debido a compuestos fenólicos contenidos en especies como *Aloysia citriodora Palau*, esta especie contiene un alto porcentaje de fenólico y estos componentes, generalmente poseen una mayor actividad antioxidante (Hashemi *et. al*, 2018), por otro lado, se ha logrado identificar mediante cromatogramas provenientes de la infusión de las hojas un perfil de polifenoles caracterizados por la presencia de ácido cafeico y flavonoides (Wernert *et. al*, 2009), se sabe también el extracto metanólico de la *Aloysia Triphylla* de sus ramas, hojas y flores posee un porcentaje cumarinas y alcaloides entre otro compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, flavonas (Bravo *et al.*), los extractos alcohólicos y acuosos poseen actividad antiinflamatoria, atribuida a la presencia de theviridosido, un glucósido iridoide, además, otro

componente común en la familia VERBENACEAE, la actividad analgésica se debe a la presencia de verbascósido y en cuanto a la actividad antipirética, el extracto acuoso es ligeramente superior al del paracetamol (Seham *et. al*, 2012).

Los estudios demuestran la amplia actividad antimicrobiana y antifúngica de los aceites esenciales de las especies de la familia VERBENÁCEA e indiscutiblemente el género *Aloysia* está entre las más estudiadas, 5 especies con gran un potencial antifúngico frente a hongos levaduriformes patógenos como la *Candida albicans* y la *Cryptococcus neoformans* (Jaimes et al. 2020), la *Aloysia Triphylla* mostrando efectos sobre el *trypanosoma cruzi* siendo un tratamiento alternativo frente a los escasos fármacos para su tratamiento (Rojas et al. 2010). Estudios realizados en Venezuela muestran el amplio espectro antibacteriano contra patógenos genitourinarios y hacen notable su uso con bajas dosis⁸ y el aceite de la *Aloysia Gratissima* es un antibacteriano efectivo contra *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteos* (Aliaga 2013), otro precedente indica que usando el medio del método de difusión en agar y de diluciones probó la inhibición del crecimiento en *E. Coli* y *Staphylococcus aureus* precisó la sensibilidad antibacteriana *in vitro*, otro artículo indica que posee actividad frente *Escherichia Coli* y *Bacillus subtilis* (Bailac et al. 1999) e incluso mostró actividad antiedematogena con un gran porcentaje de inhibición de la inflamación siendo esto último aplicado de manera tópica (Vandresen et al. 2010), así pues el género *Vitex* específicamente la planta *Vitex agnus-castus* tiene como componente principal al β -cariofileno compuesto sesquiterpénico y su aceite esencial examinado muestra una importante actividad antibacteriana *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecalis*, *Escherichia Coli* , *Proteus Mirabilis* ,*Pseudomonas, aeruginosa* ,*Salmonella typhi* T y 2. La actividad de los aceites es mayor hacia las bacterias Gram+(Senatore et al. 2003), otro estudio demostró una actividad antibacteriana moderada contra *Escherichia Coli*,

Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Ekundayo et al.), finalmente el género *Lippia* también por poseer actividad , se encontró que el aceite *Lippia alba* posee una fuerte actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* y *Candida albicans* (Fun et. al, 1990).

En cuanto a la extracción del aceite esencial, el método más sencillo y más usado a trabajar resulta ser el método por arrastre de vapor (Al Di Cara et. al, 1983), el rendimiento en general de muchos AEs *Aloysias* es de (0.21-1,35%) (Arteaga et. al, 2016). La constitución de los aceites así como la identificación de los analitos se apoya en el uso de la cromatografía gases acoplada a espectrometría de masas (Stashenko. et al. 2009,2010,2019), la detección en la *Aloysia Triphylla* da como componentes principales como 1,8-cineol (12,4%), geranial (9,9%), 6-metil-5-hepten-2-ona (7,4%) y neral (6,9%) analizado por GC y GC / MS (Bellakhdar et. al, 1994), por otro lado, para la *Aloysia Gratissima* se logró identificar también metabolitos secundarios de la clase de terpenos, un total de 14 componentes y siendo los principales componentes identificados isopinocampone (trans -3-pinanona) (25.4%), limoneno (15.1%) y guaiol (12.7%) (Trovati et. al, 2010), otro *Aloysia* con gran potencial antibacteriano es *A. Polystachya* con un contenido de limoneno (14.2%) (Pérez-Zamora et. al, 2016), en el género *Lippia* es muy común encontrar el p-cimeno es así como en la *Lippia Multiflora* P-cymene 25.27% γ -Terpinene 9.17%, el aceite esencial de *Lippia micromera* Schauer posee hasta un p-cimeno (11,5%) (Tucker et al, 1993). Otras plantas del mismo género como las *L. junelliana*, *L. polystachya*, *L. integrifolia*, *L. turbinata*, poseen en promedio p-cimeno (0.03-0.97%), limoneno (5,6-13,3%) pero un porcentaje bajo de β -cariofileno (0,04-0,08 %) otro estudio indicaría que la *L. Turbinata* podría llegar a tener a hasta un 2.13% de β -cariofileno y según Perez-Zamora un considerable porcentaje de

limonelo de 8.73%, aceite de hoja de *Vitex agnus-castus* L, sabineno (10,8%), p-cimeno (4,2%), limoneno (2,5%) (Ekundayo *et. al*, Pérez-Zamora *et. al*, 2016, Toker *et. al*, 1993).

CAPITULO II

PARTE TEÓRICA

2.1. Familia VERBENACEAE

Compuesto por unos 35 géneros y algo más de 1000 especies distribuidas en regiones cálidas y templadas de ambos hemisferios, principalmente en América. (Willmann et al, 2000) en la figura 1 se puede visualizar su distribución en los diferentes continentes, sus usos se pueden agrupar por aparatos y sistemas del cuerpo humano, por diversas dolencias (enfermedades metabólicas y enfermedades infecciosas) y por signos o síntomas (como alergias, fiebre, mareos y otros) que la población del país registra como enfermedades. (López-Villafranco et al, 2017).



Figura 1: La familia Verbenáceas y su distribución mundial (Heywood, 1985)

2.1.1 Genero *Aloysia*

El género *Aloysia* pertenece a la familia Verbenácea en el grupo principal de las Angiospermas (Plantas con flores). La Lista de plantas incluye 71 nombres científicos de plantas de rango de especies para el género *Aloysia*. De estos 51 son nombres de especies aceptados.

2.1.2 Uso y aplicación Etnomedicinal de las *VERVENACEAS*

Gran parte de conocimiento medicinal conocido actualmente sobre esta familia la debemos al país de México y sus investigaciones . Donde se registraron patologías en 16 categorías; destacan los malestares del aparato digestivo, aparato reproductor femenino, sistema músculo esquelético y síndromes de filiación cultural, donde se visualiza una similitud, al mostrarse que un 92% de las especies ya conocidas se usan para dolencias del tracto intestinal o enfermedades asociadas ala tracto digestivo (López-Villafranco *et al*, 2017). A continuación, se muestra en la Tabla 1 algunas aplicaciones:

Tabla 1: Nombres populares y usos de Verbenácea medicinales

Nombre científico	Nombre común	Uso medicinal
<i>Aloysia citriodora Palau</i>	Cedrón, té cedrón.	Aparato digestivo y sistema nervioso
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britt y P. Wilson	Salvia o hierva maestra	Aparato digestivo, aparato reproductor femenino y sistema nervioso.
<i>Verbena officinalis L.</i>	Verbena o cúralo todo	Propiedades anticancerígenas y antiespasmódico.
<i>Verbena recta Kunth</i>	Verbena de perro o verbena de cáncer	Propiedades anticancerígenas , aparato digestivo, sistema nervioso
<i>Lippia palmeri S.</i> <i>Watson</i>	Orégano común	Aparato digestivo, aparato reproductor femenino, antiespasmódico y sistema nervioso.

Fuente (López-Villafranco *et al*, 2017)

2.2. Aceites esenciales

2.2.1. Concepto

Resultan de metabolismo secundario de las plantas, los aceites esenciales son mezclas complejas de una gran variedad de compuestos volátiles, aunque no están relacionados con los ácidos grasos son lípidos.

De forma química, la gran mayoría de componentes de los aceites esenciales son hidrocarburos (pineno, limoneno) estos componentes pueden tener funciones como defensa de las plantas, de los insectos, de las condiciones medioambientales duras y de las enfermedades (Young. 2008, Yogarson et al. 2006), además los aceites esenciales, son los que le confieren a la planta sus características odoríferas (Lock 1994).

2.2.2. Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden clasificar según (SENA 2017, Martínez. 2003).

Por su consistencia:

- ✓ Esencias fluidas: a temperatura ambiente suelen ser líquidos volátiles .
- ✓ Bálsamos: líquidos espesos y poco volátiles, suelen polimerizarse fácilmente .
- ✓ Oleorresinas: la mayoría de son muy viscosos o semisólidos, poseen el aroma concentrado de las plantas.

Por su origen:

- ✓ Naturales: obtenidos únicamente de planta.

- ✓ Artificiales: obtenidos a través de procesos en los cuales se adicionan esencias con uno o varios de sus componentes.
- ✓ Sintéticos: producidos por la combinación de sus componentes, producidos a partir de la síntesis química de estos.

Su naturaleza química:

- ✓ Monoterpenoides: son aquellos con abundancia de monoterpenos (Terpenos con 10 carbonos).
- ✓ Sesquiterpenoides: son aquellos con abundancia de sesquiterpenos (terpenos de 15 carbonos)
- ✓ Fenilterpenoides: son aquellos con abundancia de fenilterpenos (terpenos de 20 carbonos).

2.2.3. Composición química

La composición química de los aceites esenciales es variada, incluso en una misma especie esta composición podría resultar distinta, la influencia cualitativa de algunos componentes no necesariamente es directamente proporcional a la cantidad del compuesto presente en el aceite esencial .

Generalmente los aceites esenciales suelen ser mezclas de más de 100 componentes con distinta naturaleza química . En la tabla 2 se muestra los componentes de los distintos grupos funcionales. Según Bakkali *et al*, (2008) y Stashenko (2019). Entre los compuestos más comunes se encuentran los alifáticos de baja masa molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos) estos pueden ser Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanos,

Según Arteaga (1980) incluso son estos componentes los que le dan el olor característico a los aceites esenciales. En la tabla 2 se muestra un resumen de algunos grupos funcionales presentes en compuestos terpénicos y sesquiterpénico.

Tabla 2: Moléculas constituyentes y sus grupos funcionales

GRUPOS FUNCIONALES	NATURALEZA QUÍMICA	EJEMPLO
Hidrocarburos	Terpenos	Limoneno
	Sesquiterpenos	P-cimeno
	Aromáticos	Beta-cariofileno
Aldehídos	Monoterpenos	citral
	Alifáticos	Nonanal
	Aromáticos	Cinamaldehido
Alcoholes	Monoterpenos	Geraniol
	Alifáticos	3-decanol
	Sesquiterpenos	Espatudenol
	Aromáticos	Alcohol bencílico
Fenoles	Aromáticos	Carvacrol

Fuente: García, 2017.

2.2.4. Elementos que afectan la calidad de los aceites esenciales.

Pueden existir algunos factores internos y externos que ejercen influencia en la buena calidad del aceite esencial según Fundación para la Innovación Agraria (2003) y Crop & Food Research (2001):

- ✓ Factores externos: el clima, la estructura del suelo, así como su pH, las plagas, enfermedades, origen geográfico, malezas, las técnicas de cultivo, época de cosecha.
- ✓ Factores internos: variabilidades en una especie idéntica ,prefloración o etapa de desarrollo de la planta, floración y postfloración, edad de la planta es decir su madurez y así como la parte de la planta de la cual fue extraída el aceite esencial.

2.2.5. Usos y Aplicaciones de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales en la actualidad los aceites esenciales tiene múltiples aplicaciones en la medicina, industria y en las ciencias SENA (2017) y Crop & Food Research (2001). Entre ellos la industria cosmética la utiliza en la fabricación perfumes o sus principios activos.

Industria de alimentos la emplean como potenciadores de sabor en productos como bebidas, helados, galletas y de más. Es en la industria de productos de limpieza donde la utilizan para dar aromas a los desinfectantes, detergentes y demás productos de uso hospitalario.

Una industria nueva en usarla es la de los plaguicidas a través de la fabricación de sustancias que se usan como pulverizantes, repelentes o atrayentes de insectos.

Finalmente, algunas esencias, como el aceite esencial de lavanda son utilizadas en productos farmacéuticos; los cuales son necesarios para el tratamiento de heridas y quemaduras.

2.2.6. Obtención de aceites esenciales

2.2.6.1. Destilación por arrastre con vapor de agua

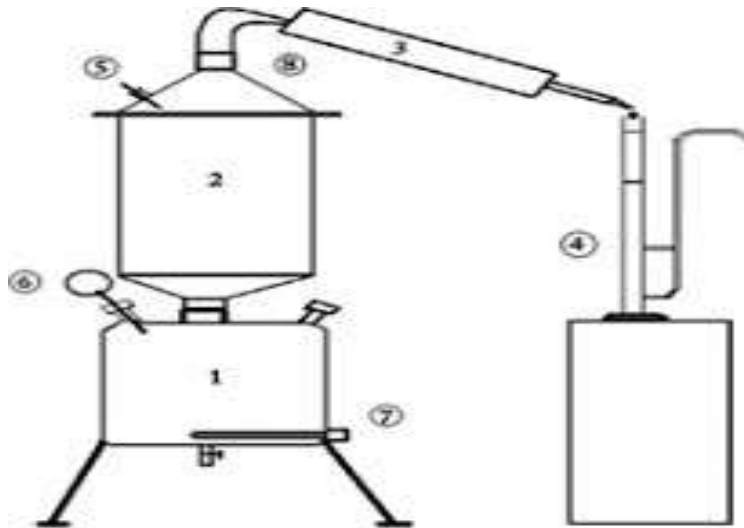
Este es el proceso más usado de extracción de aceites esenciales, aplicado en hojas y ramas en esta técnica se aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite SENA (2017) y Kuma (2000), es también la presencia de terpenoides y fenilpropanoides en el aceite esencial, los cuales son bastante volátiles y son arrestables por el vapor de agua (Molero, Consuelo, Camino & Alonso 2006).

La extracción del aceite se dará cuando el agua entra en ebullición y el vapor de agua entra en contacto con el material vegetal, el cual liberará la esencia para ser consensada.

Un esquema básico debe constar de cuatro partes : el generador de vapor que será una resistencia eléctrica (1), cámara de extracción (2), condensador (3) y el vaso o separador florentino (4). El vapor de agua generado en 1, estos vapores pasan por material vegetal que se encuentra en la cámara 2 el cual provoca que los aceites esenciales se difundan desde las membranas de la célula hacia fuera. El aceite extraído es arrastrado por el vapor de agua hacia el condensador 3 donde los vapores son condensados es así como los vapores de agua y aceite esencial que salen se enfrían hasta regresar a la fase líquida, y se separan en un decantador (SENA 2017). Ocurre que el aceite es inmiscible

y posee una menor densidad que el líquido en este caso el agua, estos se separan por gravedad con ayuda del vaso florentino 4. (Armijo et. al. 2012).

Figura 2: Destilador por arrastre de vapor a escala.



Fuente: (Armijo et. al. 2012).

2.3. Caracterización organoléptica y fisicoquímica de Aceites Esenciales

2.3.1. Análisis organoléptico

Este evalúa y cuantifica atributos positivos y negativos, según la norma técnica peruana NTP-ISO 6658 es un examen de atributos organolépticos de un producto a través de los órganos de los sentidos. Esta técnica se basa en el uso de los sentidos retronasales y olfato-gustativos, la interpretación está dada por el grado de aceptabilidad que le da el evaluador o los participantes (Loyola, López & Acuña ,2008).

2.3.2. Rendimiento del aceite esencial

Según Castaño (2012) el rendimiento se expresa como un porcentaje, el cual está dado el porcentaje en gramos de aceite esencial por cada 100 gramos de muestra vegetal.

2.3.3. Densidad del aceite

La Norma Técnica Peruana NTP-ISO 279:2011 (revisada el 2016), la define como una relación, es la relación entre la masa de un determinado volumen de aceite esencial y su volumen determinado a 20°C y la densidad relativa como una relación entre la densidad del agua a la misma temperatura.

2.3.4. Solubilidad en etanol

La ISO 875 dice que un aceite esencial es miscible con V volúmenes o más de etanol de una concentración determinada, a una temperatura de 20 °C, cuando la mezcla de 1 volumen del aceite en cuestión con V volúmenes de dicho etanol es clara y sigue siéndolo tras la adición gradual de etanol de la misma concentración hasta un total de 20 volúmenes.

Es también la solubilidad de los aceites esenciales en alcohol da una idea de su contenido en Monoterpenos, cuanto mayor sea la solubilidad, menor será el contenido de estos en la esencia o mayor será su contenido de compuestos oxigenados como alcoholes y fenoles. La técnica incluso permite detectar adulteraciones a las que se le suelen adicionar aceites vegetales o minerales, estas adiciones resultan ser insolubles en alcohol.

Por otra parte, la solubilidad en alcohol suele ser una cualidad importante para sus usos en la perfumería.

2.3.5. Índice de refracción

De acuerdo con el método NTP-ISO 280:2011 (revisada el 2016) el índice de refracción es la razón entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de la luz en la sustancia, varía con la temperatura y la longitud de onda del rayo de luz refractado.

La norma técnica peruana lo define como la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que paso del aire al aceite esencial mantenido a una temperatura constante. Este análisis óptico está relacionado de manera directa con la pureza del aceite esencial, Domínguez (1973) que establece la relación que posee con la densidad, en la tabla 5 se puede apreciar la información de nos puede brindar tanto el índice de refracción junto la densidad.

Tabla 3 Relación densidad y índice de refacción en aceites esenciales

Densidad (g/mL)	Índice de refracción	Componentes esperados
Menor a 0.9	Menor a 1.47	Mayor contenido de compuestos alifáticos o hidrocarburo.
Mayor a 0.9	Menor a 1.47	Presencia de compuestos oxigenados alifáticos
Menor a 0.9	Mayor a 1.47	Presencia de hidrocarburos aromáticos
Mayor a 0.9	Mayor a 1.47	Presencia de alicíclicos o compuestos oxigenados aromáticos

Fuente Dominguez ,1973

2.3.6. pH

Este valor indica el grado de acidez o basicidad de una solución determinada ,dicho de otra forma, mide la concentración de iones hidrógeno, según Cheves (2018) en los aceites esenciales estos resultan ser más efectivos con muchos microorganismos a un pH 5.

2.4. Análisis espectroscópico

2.4.1 Espectro infrarrojo (IR)

El espectro infrarrojo permite detectar la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, anillos aromáticos, enlaces dobles C=C cis y trans, etc., el espectro IR de la molécula es como una identificación particular de la muestra y es comparable, ya que existen bases de datos de muchos espectros (Palomino ,2001).

Skoog et al. (2018) indica que esta técnica nos brinda información de los compuestos orgánicos como sus propiedades , dado que una molécula vibra de forma constante sus enlaces se estiran ,contraen y tuercen , es así como la absorción de la luz infrarroja produce alteraciones en las vibraciones de la molécula.

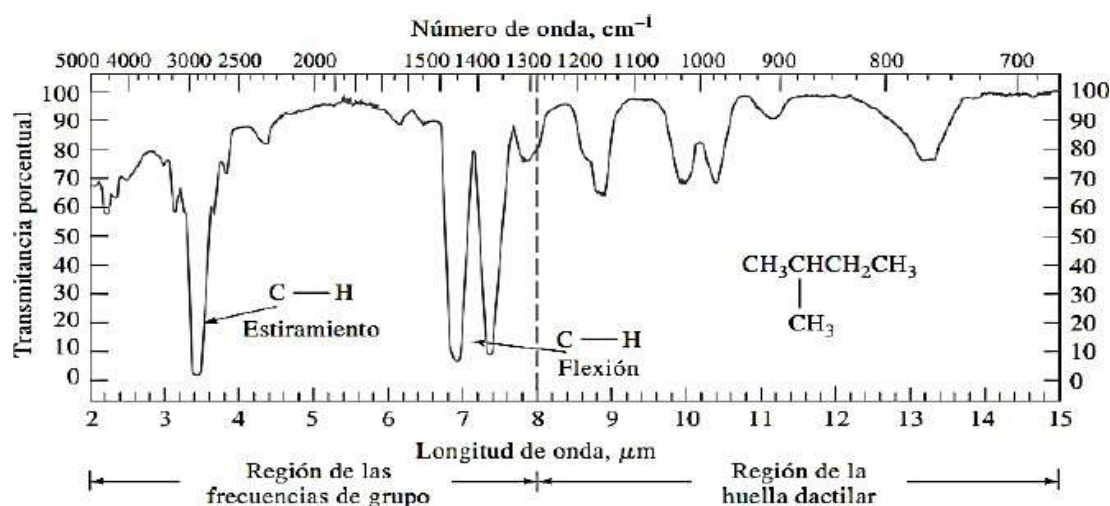


Figura 3: Espectro IR y ubicación de las regiones en una muestra de isopentano, la región de la huella dactilar (derecha) y la región de las frecuencias de grupo (izquierda), Skoog et al. (2018).

2.5. Separación e Identificación de metabolitos secundarios presentes en AE

2.5.1. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

La cromatografía es una técnica rápida y precisa para sustancias volátiles. La técnica se basa en fraccionamiento de los componentes en una fase móvil generalmente un gas y una fase estacionaria. La fase móvil atraviesa a la fase estacionaria y separa los componentes de la muestra dependiendo de las diferencias de volatilidad y de solubilidad de estas, razón por la cual cada componente sale por separado y en distinto tiempo, este tiempo es característico cuyo valor es útil al realizar la identificación de componentes (Stashenko *et al.* 2009).

Es así como cada componente al pasar por el detector se convierte en una señal eléctrica que es proporcional a la cantidad de muestra que sale, finalmente esta información es registrada en un graficador, la gráfica resultante es denominada cromatograma, en el cromatógrafo de gases en el que separa los componentes y luego

pasa a el análisis espectral mediante la conexión al espectrómetro de masas formando así un sistema CG-EM, siendo actualmente una las técnicas más importantes del análisis fitoquímico . (Stashenko *et al.* 2010)

2.6. Evaluación antibacteriana

2.6.1. Medición de halos de inhibición

El halo de inhibición es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el cual no se ha producido crecimiento antibacteriano, es una manera de medir la potencia del antibiótico frente a un microorganismo.

El diámetro de halo depende tanto de la sensibilidad y resistencia del microorganismo a estudiar. Otros factores son el tiempo de incubación, el medio de cultivo, la solubilidad, el espesor del medio, la concentración de las bacterias inoculadas , etc.Las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano, alrededor de los discos, alrededor de los discos como se muestras en la simulación (ver figura 4), la medición de esos diámetros de inhibición y su comparación con los valores de referencia permite establecer la resistencia de la cepa a determinada droga, se sabe que existen algunos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano (Juan J. Picazo 2000), particularmente en este estaremos hablando extracto antibacteriano.

El porcentaje de inhibición se calcula mediante la formula1 (Ramírez et al. 2007).

Formula 1

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\phi \text{ halo extracto} - \phi \text{ halo blanco}}{(\phi \text{ halo control positivo} - \phi \text{ blanco})} \dots\dots\dots (1)$$



Figura 4: Simulación de la formación de halos de inhibición en una muestra.

2.6.2. *Staphylococcus aureus*

Conocido como el patógeno oportunista y forma parte de la microflora humana, frecuentemente colonizando la zona nasal, con altas incidencias de colonización en los ambientes hospitalarios (Wensel et al 1998).

S. aureus es una bacteria patógena y en su género es la de mayor potencial infeccioso tanto en humanos y animales (Cervantes *et al.*, 2014).

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Micrococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *Staphylococcus aureus*

Fuente: Manual de Bergey's. 2005.

2.6.3. Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*.

Existen enfermedades, las cuales que aparecen durante la estancia hospitalaria, son uno de los problemas más trascendentales en salud pública y poseen efecto económico y social; por lo que, es necesario conocer la epidemiología y el impacto

que estas infecciones tienen en el paciente crítico. Las infecciones son frecuentemente asociadas a *S. aureus* por presentar una de las principales causas de brotes de infecciones hospitalarias (Cervantes *et al.*, 2014).

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Materiales reactivos y equipos

3.1.1. Materiales

De campo : tijeras, cuchillas, costal, plumones, lapiceros, cámara fotográfica, etiquetas papel Kraft y cajas de cartón.

De laboratorio: materiales de vidrio y plástico de uso comun.

3.1.2. Reactivos

Etanol al 96, sulfato de sodio anhidro Merck ASC, Cloroformo ACS J.T Beacker, Hexano ACS Merck,

3.1.3. Equipos

Cromatógrafo de Agilent ® Technologies 7890A GC-System equipado con una columna capilar DB5-MS, 30mx0.25 mm i. d, cromatógrafo (GC), Agilent ® Technologies 5975C, Inert XL MSD con detector Triple-Axis; Equipo semiindustrial de extracción de por arrastre vapor, Balanza de precisión AND I310, Balanza analítica Sartorius Quintix 124-1S, Molino de martillos Perten 3100, Micropipeta Brand transferpette-S (100-1000 uL), cocinilla , WYA-2S Abbe refractómetro digital, espectrofotómetro Espectrum 100 FT-IR Spectrometer marca Perkin Elmer acoplado al universal ATR Sampling accessory (PerkinElmer precisely).

3.2. Análisis preliminar

3.2.1. Recolección

La investigación es de tipo experimental. El material vegetal fue recolectado en el distrito de Tintay, provincia de Aymaraes, en el departamento de Apurímac, a 2772 metros de altitud.

3.2.2. Secado y molienda

La muestra *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke recolectada en la etapa 1, después de su recolección se secó en el mismo pueblo de Tintay a sol de la tarde (a partir de las 3pm), durante dos horas por 3 días y se almaceno en papel Kraft hasta molienda.

Se realizo una primera molienda para reducir el tamaño de la muestra, para esto se usó un molino de martillos Perten 3100, el tamaño de las partículas fue de 40 µm. un polvo fino.

3.2.3. Obtención de extracto Etanólico

La muestra *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke recolectada en la etapa 1, un total de 623 gramos se sometieron a maceración en frío se usando 3 litros de etanol al 96%, este se colocó en recipientes ámbar por 15 días, seguidamente se filtró el extracto Etanólico resultante.

El extracto se almaceno en frasco ámbar, para proceder con la marcha fitoquímica.

3.3 Marcha fitoquímica

Para el estudio de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke se desarrolló una marcha fitoquímica, para ello, se aplicó diferentes métodos para la detección preliminar de los componentes químicos de la planta basados en los procedimientos de la marcha fitoquímica de la guía del laboratorio de Productos Naturales 2019, Olga Lock (1994) y Muñoz Pinto(2016), Anexo 1 cuales muestran los principios basados en la extracción de metabolitos secundarios con solventes apropiados, aplicación de pruebas de coloración y evidencia de precipitados.

3.4 Extracción de aceite esencial

3.4.1. Preparación de la Materia Vegetal

La muestra en estudio de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, fue la obtenida en la etapa 2 de la recolección, la cantidad de muestra fue de 673.84 gramos, envuelta en una bolsa plástica, se acondiciono una caja de cartón, la muestra fue llevada a lima con un tiempo total de viaje fue 48 horas, lo cual garantizó que la muestra llegara en óptimas condiciones (hojas verdes y frescas)

La obtención y caracterización del aceite esencial de "Lima-lima" se realizó de acuerdo a la secuencia que se observa en la Figura 5.

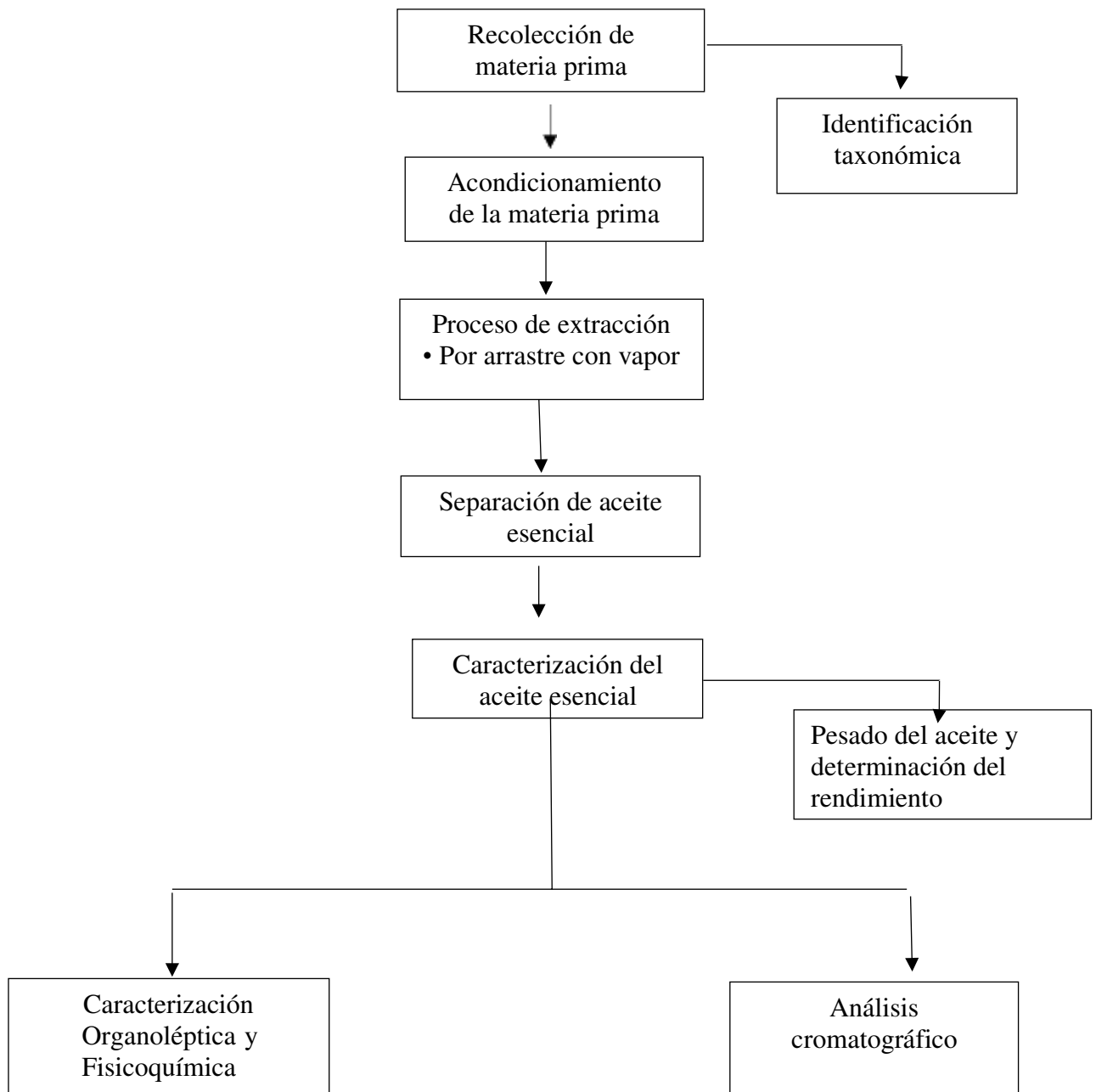


Figura 5: Diagrama de flujo de la obtención y caracterización del aceite esencial de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke.

3.4.2. Extracción de aceite esencial por arrastre de vapor

Inicialmente, se realizó el lavado del equipo extractor con agua, así como los envases donde se recolectaron las soluciones resultantes del destilado. En la extracción se usaron aproximadamente 18 litros de agua, estas fueron medidas con un balde de 4 litros de capacidad. Se colocaron las mallas que permitieron que el material vegetal no esté en contacto directo con el agua, sobre la malla fueron colocadas 673.84 gramos de las hojas y ramas seguidamente se colocó la tapa, se aseguró la hermeticidad del proceso, después se aplicó calor con el quemador eléctrico, donde se tomó la hora de inicio del destilado, también se tomaron el tiempo en el que inició el goteo, el cual fue a los 90 minutos de haber iniciado el proceso y el tiempo final del proceso fue de tres horas, tiempo en el que se recolectó la solución del destilado.

El aceite esencial se secó usando sulfato de sodio anhidro y seguidamente se reservó en refrigeración (3°C) preferente en la oscuridad.

3.5. Evaluación Organoléptica y fisicoquímica

3.5.1. Análisis organoléptico

En la muestra se evaluaron y cuantificaron atributos positivos y negativos, se emplearon los sentidos retronasales y olfato-gustativos.

3.5.2. determinación del rendimiento del aceite esencial

Se pesó la masa material vegetal antes de la destilación y se midió el volumen del aceite una vez extraído, con estos datos se estableció una densidad relativa del aceite usando un picnómetro y se relacionó con la fórmula de la densidad :

fórmula para determinar la densidad (formula 2)

$$D_{25} = \frac{m}{v} \dots\dots\dots (2)$$

Se reemplazó los datos obtenidos despejando las masas del aceite:

(formula 3)

$$m = D_{25} * v \dots\dots\dots (3)$$

Donde:

- D_{25} = densidad relativa a 25°C (g/ml)
- m=masa obtenida g
- v= volumen del aceite obtenido ml

Se determino el peso y el volumen del aceite esencial obtenido . Mediante NTP 319.079:1974 (revisada el 2016) donde se hace uso de una operación matemática sencilla se determinar el rendimiento del aceite esencial (RAE %).

El rendimiento del aceite esencial se obtuvo en base al peso húmedo del material vegetal en función a la siguiente relación . (formula 4).

$$R.A.E.\% = \frac{Peso_{aceite\ esencial}}{peso_{material\ vegetal}} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

3.5.3. Determinación de la densidad de Aceite esencial

La Norma Técnica Peruana NTP-ISO 279:2011 (revisada el 2016), como primer paso se pesó el picnómetro de 1 ml de capacidad, seco y vacío a una

temperatura de 15°C , se enraso con el aceite esencial , verificando que la temperatura se mantenga en 25°C durante aproximadamente 10 min. Luego de ser necesario se usará papel adsorbente para secar y retirar el exceso de aceite se la parte exterior del picnómetro, seguidamente se vuelve a pesar nuevamente (Ordoñez & Peña, 2008).

Se realizarán tres repeticiones del ensayo donde se obtiene el promedio los resultados se deben aproximar hasta la cuarta cifra decimal.

la densidad relativa será determinada a partir de la diferencia de masas del aceite esencial y el agua destilada , densidad relativa a 25° C (formula 5)

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M} \quad \dots\dots\dots (5)$$

- *M₁: peso del picnómetro con la muestra de AE.*
- *M₂: peso del picnómetro con el agua destilada*
- *M: peso del picnómetro vacío.*

3.5.4. Solubilidad en etanol

Estas pruebas se realizaron a una temperatura de 20°C, en vaso de precipitado se colocó una pequeña cantidad de etanol al 96 % de pureza, 2 ml aproximadamente, se le agregaron unas gotas de aceite esencial con agitación constante, verificando visualmente y obtener una solución límpida, esto validará si este es soluble o no, bajo las mismas condiciones se realizó las pruebas para otros 2 solventes cloroformo y hexano.

3.5.5. Índice de refracción

Se verifico la temperatura de 25,1°C del aceite esencial, se coloca una pequeña cantidad en el dispositivo en este caso un refractómetro provisto de un dispositivo óptico.

Se calibra el refractómetro con agua destilada a una temperatura de 25°C, para la lectura se colocó una gota del aceite esencial en el prisma (Martines et al. 2012). El análisis se realizo por triplicado se tomará en cuenta hasta la tercera cifra decimal y se reporta el promedio.

3.5.6. pH

Se usó pH indicador strips-Merck, se introdujo directamente en el aceite obtenido AE se comparó el color obtenido con la referencia incluida en test.

3.6. Métodos espectroscópicos

3.6.1. Espectro infrarrojo (IR)

Para determinar el espectro se colocó una gota de la muestra del aceite esencial de obtenido en una celda NaCl, la cual fue introducida en el espectrofotómetro *Spectrum 100 FT-IR Spectrometer* marca Perkin Elmer acoplado al universal ATR *Sampling accessory (PerkinElmer precisely)*, teniendo como rango de lectura de 4000 – 650 cm^{-1} a una temperatura 20° C y se usó el programa *spectrum*.

3.7. Separación e identificación

3.7.1. Cromatografía de gases (CG)

El Dr. Jesús Rodilla realizó el análisis cromatográfico, este análisis fue realizado con un cromatógrafo de *Agilent® Technologies 7890A GC-System* equipado con una columna capilar DB5-MS, 30mx0.25 mm i. d., con film de *Polidimetil Siloxane (J & W LTM Column module)* de un espesor de 0.25 µm. La temperatura inicial de la columna es de 60°C durante 5 minutos, aumentando de 60°C a 200°C, con una rampa de aumento de temperatura de 4°C/min, en la siguiente rampa de temperatura aumenta de 200°C hasta los 280°C con una rampa de crecimiento de 10°C/min; la temperatura final se mantiene constante durante 35 minutos. La temperatura del inyector es de 250°C, el detector se encuentra a una temperatura de 180°C. El gas de arrastre es Helio con un caudal de 1 mL/min, el volumen de inyección de la muestra es de 1 µL.

3.7.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Realizado en un detector acoplado al cromatógrafo (GC), corresponde a un *Agilent® Technologies 5975C, Inert XL MSD con detector Triple-Axis*, operando en las condiciones indicadas anteriormente, con un voltaje de ionización de 70 eV y con la fuente iónica a una temperatura de 230°C. A análisis se realiza aproximadamente en 110 min.

Análisis de los resultados El análisis de los resultados se realiza con el software Chemstation para el análisis de las áreas obtenidas para los varios componentes, la identificación de todos los espectros de masa y de cada pico se realizó usando la siguiente base de datos del *Nist Mass Spectral Software, Wiley* y el libro de *Robert Adams (2017)*.

3.8. Análisis Microbiológico

3.8.1 Cepas microbianas

El Dr. Nelson Bautista realizó el ensayo de actividad antimicrobiana, en donde se utilizaron 3 cepas bacterianas y una cepa fúngica (hongo). Todas las cepas utilizadas fueron cepas clínicas aisladas de muestras clínicas humanas proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM. Las cepas bacterianas fueron *Escherichia Coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativas) y *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) y *Candida albicans* (hongo).

3.8.2. Preparación de inóculos y ensayo de actividad antimicrobiana

La técnica utilizada fue difusión en pozo en agar. Se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los microorganismos aislados mantenidos en agar inclinado, se cultivaron en agar tripticasa soya (TSA) para las bacterias y del hongo en agar Sabouraud.dextrosa, se incubaron a 37 °C x 24 h. Después de este tiempo se realizó la preparación de las suspensiones microbianas en suero fisiológico a 0,5 de escala de McFarland. De cada suspensión microbiana se tomó 50 µL y se mezcló con 20 mL de agar Mueller Hinton licuado estéril a 45 °C para las bacterias y agar Sabouraud para *Candida albicans*, luego se pasó a placas Petri, se dejó solidificar y se realizó 3 pozos de 8 mm de diámetro en cada placa utilizando un sacabocados estéril. En un pozo de las placas se colocó 100 µg de la muestra (crema), en el segundo pozo se colocó 50 µL de solución gentamicina (control +) para las bacterias y fluconazol (control +) para *Candida albicans* y en el tercer pozo se colocó 50 µL de suero fisiológico (control -). Las placas de bacterias fueron incubadas a 37 °C entre 24 a 48h en este tiempo se verificó la presencia de los halos de inhibición alrededor de los pozos. En las placas con presencia de halos de inhibición se midieron el diámetro de los halos en milímetros (mm). Los ensayos para la muestra se realizaron por duplicado.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. Recolección y muestreo

El material vegetal fue recolectado en época de lluvia (invierno) en la quebrada de tajona como se muestra en las figuras 6 y 7, esto en el distrito de Tintay. La zona de extracción es de alta humedad se pueden apreciar pequeñas corrientes de agua (los pobladores las conocen como acequias). El muestreo se realizó procurando obtener las hojas más verdes, se cortaron y recolectaron las ramas, hojas tiernas y maduras algunas en estado de floración, generalmente se contaron las puntas altas con se muestra en la figura 8. Obteniéndose un peso aproximado de 0.600 kg de muestra vegetal, la muestra consta de 40 a 50 ramas, inmediatamente de la recolección la muestra se envolvió en bolsas plásticas para posteriormente ponerlas en una caja de cartón, para ser enviada a la lima este trayecto demora 10 horas, hasta llegar al laboratorio.



Figura 6: Localización del punto de muestreo.



Figura 7: Quebrada de Tajona- TINTAY.



Figura 8: Fotografías Muestreo de Lima-lima.

Esta recolección fue en dos etapas como se muestra en la tabla 4:

Tabla 4 Muestreo de material vegetal

Etapas	Fecha de recolección	Uso	Cantidad
1	Marzo 2019	Extracto Etanolico	623 gramos
2	Junio 2019	Aceite esencial	673.84 gramos

4.2 Taxonomía y características botánicas *Aloysia aloysioides* loes & Moldenke

La planta fue identificada y clasificada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el Mgs. Asunción Cano Echevarría, posición asignada de acuerdo al Cronquist (1988)

- División : *Magnoliophyta*
- Clase : *Magnoliopsida*
- Subclase : *Asteridae*
- Orden : *Lamiales*
- Familia : *Verbenaceae*
- Género : *Aloysia*
- Especie : *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke
- Nombre vulgar : “lima-lima”
- Constancia : 124-UNMSM-2019



Figura 9: *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke.

Es una planta tipo arbustiva, hojas angostas y alargadas, ásperas, delgadas, de 3 - 5 cm de largo, de olor agrídulce muy característico, que se caen en otoño. Flores pequeñas, blancas o violeta pálido, dispuestas por lo general en espigas terminales, que puede alcanzar una altura hasta 2,00 m.

Las hojas son simples, rugosas de color verde claro, presenta una nervadura mediana, saliente en la cara inferior, presenta también flores son pequeñas, de color

blanco por fuera y ligeramente violáceas y se encuentran en el extremo de los tallos en forma de espigas agrupadas.

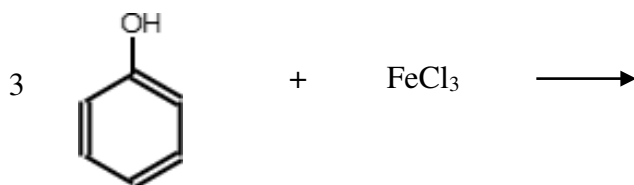
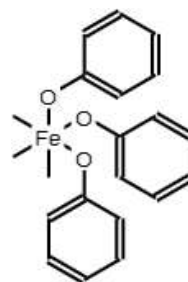
4.3. Usos y aplicaciones Etnomedicinal


La “lima-lima” es una planta bastante popular en el pueblo en Tintay, se suelen preparar infusiones de las ramas y hojas, para contrarrestar algunos tipos de afecciones gastrointestinales, digestiones pesadas, espasmos, meteorismos y en algunos casos como calmante para problemas del sistema nervioso (De acuerdo con la información recabada de los pobladores).

4.4. Marcha fitoquímica

Se emplearon como base en la marcha fitoquímica descrita por look Ugaz (1994) y la marcha la guía de prácticas de laboratorio de productos naturales (2019), se realizó de acuerdo a la secuencia (ver Anexo 1), los resultados se presentan en la Tabla 5 y el registro fotográfico en anexo 2.

A partir del extracto Etanólico acuoso se realizaron las pruebas de identificación de tanino, saponinas y flavonoides. Se utilizo una solución al 1% de FeCl_3 que mostro una coloración verde reacción en figura 10, dado que la reacción de Cloruro férrico con el fenol da un compuesto coordinación coloreado verde por la presencia de los taninos catéquicos.






Flavonoide
 Acetofenona (Amarillo)

Además, la prueba de espuma para identificar saponinas resulto siendo negativa. Finalmente, Las cumarinas en presencia del medio alcalino y sometido a Luz UV tienen fluorescencia verde amarillenta, esta prueba se realizó una lampara UV a 365nm, la reacción se muestra en la en figura 12; prueba que nos indicó la abundancia de estos compuestos , esto ocurre por la fuerte influencia de la naturaleza y posición de los sustituyentes, que se modifica profundamente en medio alcalino, exaltada en presencia de una base. (Herrera Et al. 2017)

fluorescencia verde amarillenta


Cumarina $\xrightarrow{\text{NaOH}}$ Ác. cis-o-hidróxicinámico $\xrightarrow{\text{Luz UV}}$ Ác. trans-o-hidróxicinámico

60

La identificación de alcaloides se realizó usando únicamente la secuencia descrita en la de Guía de Prácticas de Laboratorio De Productos Naturales, usando el extracto Etanolico estas pruebas incluían el uso de 4 reactivos: reactivo de Dragendorf, de Wagner, de Mayer y Otto, las 4 pruebas resultaron negativas para alcaloides.

La identificación cualitativa de la *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke en estudio indica la posible existencia de compuestos fenólicos como taninos, flavonas y la posibilidad de encontrar xantonas, a su vez contiene proporción abundante de cumarinas fijas, no contiene compuestos denominados saponinas, asimismo no contiene alcaloides, en el Anexo 2 se muestran las pruebas realizadas y en la tabla 5 un resumen de los resultados de la marcha fitoquímica. Finalmente, no existen estudios previos del extracto Etanolico de esta planta; por tanto, este seria es el inicio de futuras investigaciones.

Tabla 5: Resultados de la marcha fitoquímica.

Metabolitos	Ensayo	Color	Resultado
Alcaloide	Reactivo de Dragendorf	pp verde	-
	Reactivo de Wagner	pp amarillo	-
	Reactivo de Mayer	amarillo	-
Flavonoide	NaOH al 10%	amarillo	++
Taninos	FeCl ₃ al 1%	Verde	++
Saponinas	Prueba de la espuma		--
Cumarinas	Prueba de fluorescencia con lampara UV	Verde amrillento	+++

Nota; identificación de metabolitos: - ausencia, + poco, ++moderado, +++abundante.

4.5. Aceite esencial

4.5.1 Evaluación organoléptica y fisicoquímica

En la tabla 5 se detalla de que el *AE* posee características organolépticas en la figura 13 se aprecia el líquido obtenido.

Tabla 6: Características organolépticas teóricas y experimentales de Aceite esencial de Lima-lima.

Parámetro	Resultado experimental	Resultado teórico (Aloysia citridora)
Color	Amarillo claro	Amarillo claro
Olor	Herbáceo y cítrico	Herbáceo y cítrico
Sabor	cítrico – Fresco no persistente	cítrico – fresco poco persistente
Aspecto común	Líquido translucido y fluido	Líquido translucido y fluido

En cuanto a la obtención del RAE del aceite esencial del *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke “Lima-lima”, con un rendimiento de 0.38 %, respecto al material base seca; valor que se considera dentro de los intervalos estándar para los aceites esenciales, para confirmar esto la tabla 7 se muestran rangos de porcentajes de RAE ,en tres diferentes especies de *VERBENACEAS* entre ellos , el género *Aloysia* (Rojas et al 2010,Teixeira et al 2007), el género *Lippia* y en genero *Vitex* (Linde et al 2016 ,Stashenko et al 2014, Suksamrarn et al 1991) hacer tabla comparados.

Tabla 7: RAE % En diferentes especies de *VERBENACEAS*.

Aceite esencial	RAE %
Aloysia	0,2-1,69
Lippia	0,7 – 4,4
Vitex	0,13-0,15

El R.A.E. % determinado mediante la fórmula dada en la norma técnica peruana N° (NTP 319,079).

$$\text{R.A.E. \%} = \frac{\text{Peso}_{\text{aceite esencial}}}{\text{peso}_{\text{material vegetal}}} \times 100$$

$$\text{R.A.E. \%} = \frac{2.5575 \text{ gramos}}{673.84 \text{ gramos}} \times 100$$

$$\text{R.A.E. \%} = 0.38\%$$

El valor obtenido del R.A.E. % para una extracción es que se dio en las condiciones ambientales que se indican la tabla 8.

Tabla 8: Condiciones de extracción de AE.

Humedad (%) Promedio	56%
Estación de Extracción	otoño- Junio
Temperatura Ambiental	24°C

La densidad del aceite esencial de la *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke “lima-lima”.

Vaso de 50 ml vacío = 71.2132g

Probeta con el aceite esencial = 17,3837g

Masa = 0.1705 g

Volumen = 0.2 ml

Usando la fórmula 2, la densidad absoluta se obtiene de la siguiente manera para m1:

$$D_{25} = \frac{m}{v} = 0.8525 \text{ g/ml}$$

Se realizaron 3 repeticiones como se muestra en la tabla 9

Tabla 9 Densidad Absoluta del *Aloysia Aloysioides Loes & Moldenke*

	m1	m2	m3	Promedio	Desv.Stad	CV	% CV
Densidad absoluta	0.8525	0.8542	0.8596	0.8561	±0.0030	0.0035	0.35

La densidad relativa del aceite esencial de *Aloysia Aloysioides Loes & Moldenke*, se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Determinación de la Densidad mediante Picnometría de 1 mL a 25° C del aceite de las hojas de *Aloysia Aloysioides Loes & Moldenke*.

	m1	m2	m3	Promedio			
M	5.4164	5.4265	5.4215	5.4215			
M1	6.2709	6.2807	6.2811	6.2776			
M2	6.3890	6.3883	6.3935	6.3903	Desv.Stad	CV	% CV
D25	0.8785729	0.8881264	0.8843621	0.8836705	±0.0048	0.0054	0.54

La medida del pH del aceite esencial de *Aloysia aloysioides Loes & Moldenke* “lima-lima” usando el papel indicador nos indica un valor de 5, ver figura 13.

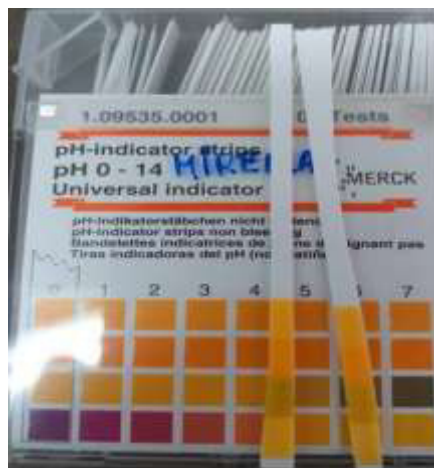


Figura 13: Determinación de pH del AE.

En cuanto solubilidad del aceite esencial se realizaron pruebas en la muestra con solventes como etanol, cloroformo y hexano como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11: Solubilidad de AE.

Solvente	Soluble
Etanol	+++
Cloroformo	-
Hexano	-

Nota: +++ muy soluble, ++ moderadamente soluble, + poco soluble, - no soluble

El método se realiza a una temperatura de 20°C y consiste en ir agregando progresivamente el aceite esencial, es la presencia de compuestos oxigenados hidrofílicos que hacen posible la solubilidad del aceite esencial en etanol, es esta cualidad de ser solubles en etanol la que los hace aptos para su uso en la industria de la perfumería, Además esta solubilidad de las esencias en alcohol da una idea de su contenido en Monoterpenos. (Bandoni, 2003).

La determinación de índice de refracción se puede apreciar en la tabla 10 los resultados obtenidos en el laboratorio realizados por duplicado obteniéndose un valor promedio de 1.4799, figura 41 y 42 registro fotográfico (anexo 3).

Tabla 12: Índice de refracción Aceite esencial de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke a una temperatura de 20.1°C.

	M ₁	M ₂	M ₃	PROMEDIO	Desv.stad	CV	% CV
Índice de refracción	1.4799	1.4799	1.4797	1.4798	0.0001	0.0001	0.01

Se sabe que índice de refracción es la razón entre la velocidad de un haz de luz y la velocidad de la sustancia, y que esta varía con temperatura y la longitud de onda del rayo de la luz refractado, el valor 1.4798 a su vez este resultado indicaría y junto con la densidad 0.8561 g/ml obtenido en el AE, se demuestra que este posee un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos según la relación dada por Domínguez (1963).

Según lo reportado en la literatura podemos apreciar en la tabla 13 que valor obtenido se encuentra un ligeramente por debajo a los de la familia de las *VERVENACEAS*.

Tabla 13: Índice de refracción en *VERVENACEAS*.

Genero	Índice de refracción (25 °C)
Aloysia	1.4852
Lippia	1.4977
Vitex	1.485-1.500

4.5.6. Análisis espectrocópico

4.5.6.1. Espectroscopía infrarroja

En la figura 14 se muestra el espectro FT-IR del aceite esencial de *Aloysia Aloysiodes* Loes & Moldenke, que permitirá identificar los grupos funcionales contenidos en los componentes químicos del aceite esencial

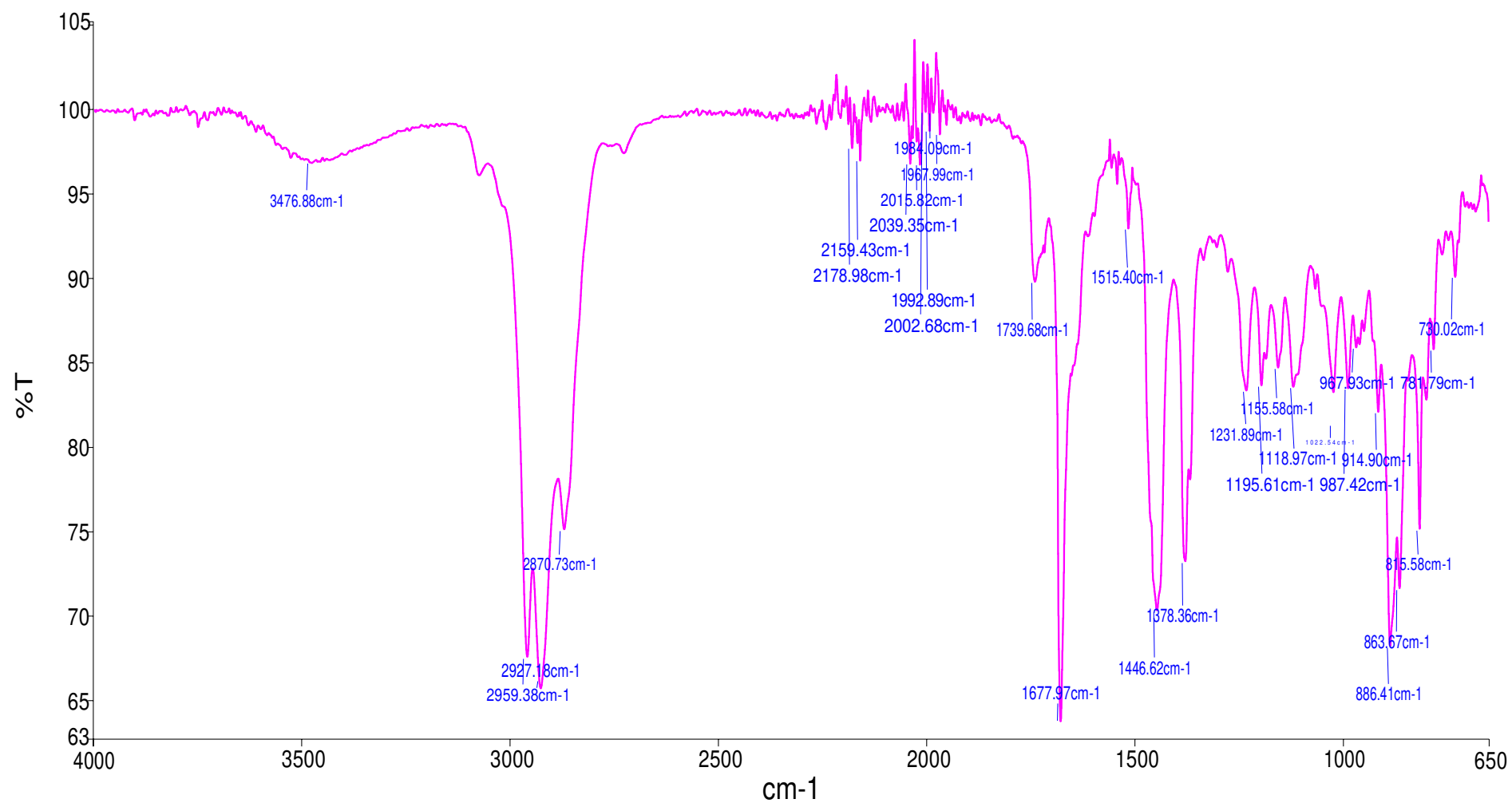


Figura 14: Espectro Ir del AE, *Aloysia Aloysioides* Loes & Moldenke.

El espectro de IR de una molécula ser la identificación característica de ella misma, además puede comparar con una base de datos de espectros, además de (Palomino, 2001). En este sentido, analizando el espectro IR, se observa, una banda de tensión O-H enlazado a un aromático a 3476.88 cm^{-1} para las bandas alrededor de 3000 en cm^{-1} (2927 , 2959 y 1378 cm^{-1}), son característicos de la torsión y del estiramiento de enlaces tipo C-H de los radicales metilos ($-\text{CH}_3$), como los dimetilos terminales que se hallan en el 6-metil-5-hepten-2-ona, citral y la α -tujona. El estiramiento del C=O en los picos 1739 y 1677.97 cm^{-1} del grupo carbonilo y evaluado con la torsión C--H que se muestra a 1378.36 cm^{-1} , esto podría deberse a la presencia de aldehídos, con enlace C=C ubicado en su cadena principal se muestra en el pico 1677.97 cm^{-1} , esta coincidiría con la estructura del citral, este compuesto presente en el aceite esencial de las *Aloysias*. Además, se muestran más picos de adsorción 1446.62 cm^{-1} , típicos de la torsión de tijeras de radicales metilenos ($-\text{CH}_2-$) de compuestos cíclicos pequeños ($\text{C}_5\text{-C}_8$). También se visualizan picos en las bandas 2959.38 y 1446.62 cm^{-1} que corresponden posiblemente a grupos metilenos terminales ($=\text{CH}_2$), como los hallados en las moléculas de Espatulenol o el del limonelo. Los picos de adsorción entre las bandas en 1195 y 1118.97 cm^{-1} se deben a la presencia de alcoholes secundarios y terciarios debido al estiramiento de del enlace C--OH. Además, se observa que alrededor de 2000 cm^{-1} , hay varios picos pequeños, el cual nos indica que el aceite esencial tiene aromáticos, en la tabla 14 se muestran otros puntos resaltantes.

Tabla 14: Bandas de absorción y estructuras orgánicas del espectro infrarrojo (IR) del aceite esencial de lima-lima.

Bandas cm⁻¹	Grupo funcional identificado	Observaciones
3476.88	O-H	una banda de tensión O-H enlazado a un aromático
2959	-CH ₃	Doblete debido a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica del C-H independiente de la molécula
2959-2870	-CH ₃ , -CH ₂ -	Vibración de alargamiento de enlaces C - H característico de compuestos orgánicos. Valor es útil para determinar la hibridación del átomo de carbono, corresponde a carbono sp ³ (alcano o posibles grupos alquilo)
2870	-CH ₂ -	Vibraciones simétricas del átomo de hidrógeno, independiente del tamaño de la molécula.
1739,67	(C=O)	Vibración de alargamiento del carbonilo (C=O) valor característico de aldehídos y cetonas.
1446	-CH ₂ -	Flexión de carbono – hidrógeno.
1446	-CH ₃	Característico del grupo metilo.
1378	-CH ₃ , -CH ₂ -	Característico del isopropil (dos grupos metilo en el mismo carbono)
1364	-CH ₃	Alcano, metilo – geminal.
987	Alifáticos	Bandas muy débiles con difícil designación
914 – 967	Alifáticos	Bandas muy débiles con difícil designación
815 – 886	=C-H	Alquenos, hidrocarburos aromáticos.
730 – 781	C-H	Debido a vibraciones del carbono – hidrógeno

4.5.6.2. Resultados del análisis cromatográfico CG-MS

En la figura Tabla 15 se visualizan los componentes con porcentaje mayor a 0.5 %, estos constituyen el 99.9%; su identificación fue realizada mediante búsqueda computarizada en la librería con las siguientes bases de datos: *Nist Mass Spectral Software*, y *Wiley*, en la figura 16 se muestra es espectro de masa obtenido.

Respecto de composición, de los treinta componentes identificados, el 30.81% monoterpenos , monoterpenos oxigenados de 11.32 % ,sesquiterpenos 22.94 % y finalmente con un 18.35% de sesquiterpenos oxigenados estos mostrados en la figura 17.Los componentes mayoritarios identificados fueron: β -Cariofileno (10.88 %), limonelo (9.9 %), p-cimeno (7,22%), Oxido de cariofileno (5.98 %), Nerolidol (4.96 %) y α -humuleno (4.92 %). Los resultados solo confirman la estrecha relación que posee con el aceite esencial de la *Aloysia Thyphylla* siendo esta de la misma familia estudiada en Argentina el α - β -Cariofileno (3.3%) y otra en Venezuela , β -Cariofileno (2.1 %).

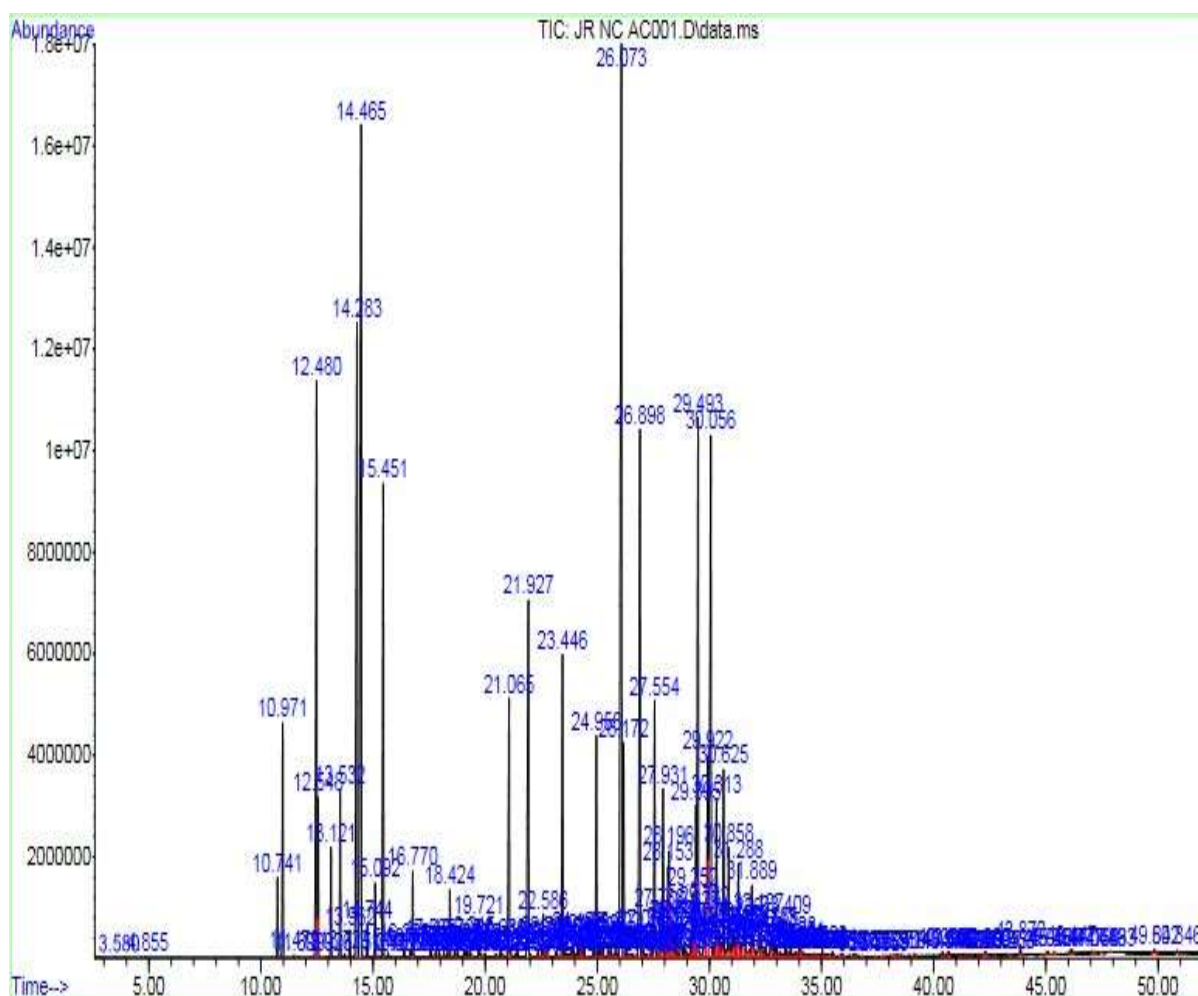


Figura 15: Cromatograma GC-MS aceite esencial de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke.

En la Figura 16 se muestra el cromatograma del aceite esencial de lima-lima, a un intervalo de tiempo de 3.59 a 50.85 minutos. Se tiene una gran variedad de picos donde sobresalen los de 14.465 y 26.073 minutos. El primero corresponde limonelo y β -Cariofileno, dos de los principales componentes de los extraíbles de lima-lima.

Tabla 15: La composición del aceite esencial.

Componente	Abundancia %	RT	Formula global
β-Cariofileno	10.88	26.07	C ₁₅ H ₂₄
p-cimeno	7.22	14.28	C ₁₀ H ₁₄
limonelo	9.49	14.46	C ₁₀ H ₁₆
Oxido de cariofileno	5.98	30.06	C ₁₅ H ₂₄ O
Sabineno	5.61	12.48	C ₁₀ H ₁₆
Nerolidol	4.96	29.49	C ₁₅ H ₂₆ O
α-humuleno	4.92	26.9	C ₁₅ H ₂₄
γ-terpineno	3.8	15.45	C ₁₀ H ₁₆
Citral	3.67	21.93	C ₁₀ H ₁₆ O
Gemacreno D	2.22	27.33	C ₁₅ H ₂₄
Espatulenol	2.14	29.92	C ₁₅ H ₂₄ O
neral	2.29	21.06	C ₁₀ H ₁₆ O
Acetato de Mirtenilo	2.31	23.45	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
α-pineno	1.72	10.97	C ₁₀ H ₁₆
α-felandreno	1.18	13.53	C ₁₀ H ₁₆
β-pineno	1.05	12.55	C ₁₀ H ₁₆
Acetato de Geranilo	1.62	24.96	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
α-Chamigreno	1.72	26.1	C ₁₅ H ₂₄
Biciclogermacreno	1.31	27.55	C ₁₅ H ₂₄
Germacreno B	1.2	29.39	C ₁₅ H ₂₄
Guaiol	1.24	30.18	C ₁₅ H ₂₆ O
Oxido Humuleno	1.59	30.37	C ₁₅ H ₂₄ O
Endo-1-bourbananol	0.94	30.51	C ₁₅ H ₂₆ O
Cadinol Isomero	0.83	31.29	C ₁₅ H ₂₆ O
β-Mirceno	0.74	13.12	C ₁₀ H ₁₆
Hidrato de Sesquisabineno	0.67	29.14	C ₁₅ H ₂₆ O
Butirato de Geranilo	0.82	28.11	C ₁₄ H ₂₄ O ₂
β-Bisaboleno	0.69	28.15	C ₁₅ H ₂₄
Linolool	0.61	16.77	C ₁₀ H ₁₈ O
otros componentes (>0,5%)	17.1		
TOTAL	99.9		

El componente mayoritario es el beta-Cariofileno, con casi 11 % del aceite esencial, además también se identificó y verificó la presencia del limoneno, se concluyó que este componente de la planta es el que le proporciona al aceite de lima-lima un sabor y olor

agradable, pues su contenido es importante, aunque menor al beta-Cariofileno. Como se puede apreciar en la **Figura 17** el contenido de Sesquiterpenos y Monoterpenos presentes en el aceite de esencial de lima-lima expresado en porcentajes, cuya diferencia es del 7.68%, que hace notable la cantidad elevada de Sesquiterpenos presentes en la *Aloysia Peruviana* y la distingue de otras especies *Aloysias* reportadas en estudios previos .

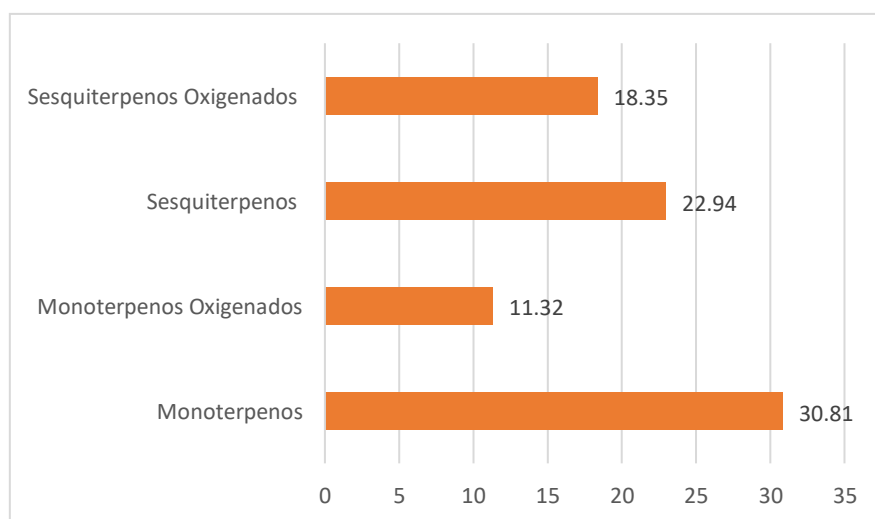


Figura 16: Porcentaje de Terpenos.

Como se muestra en la **Figura 18** el porcentaje de alquenos y compuestos alcohólicos son los que conforman el grupo mayoritario, otorgándole una la condición de compuesto polar al aceite esencial de lima-lima, es esta la razón por la cual la solubilidad se hace visible con el etanol que es un compuesto polar, demostrando de forma indirecta porque no es soluble en compuestos como el cloroformo y hexano ya que estos dos son solventes apolares.

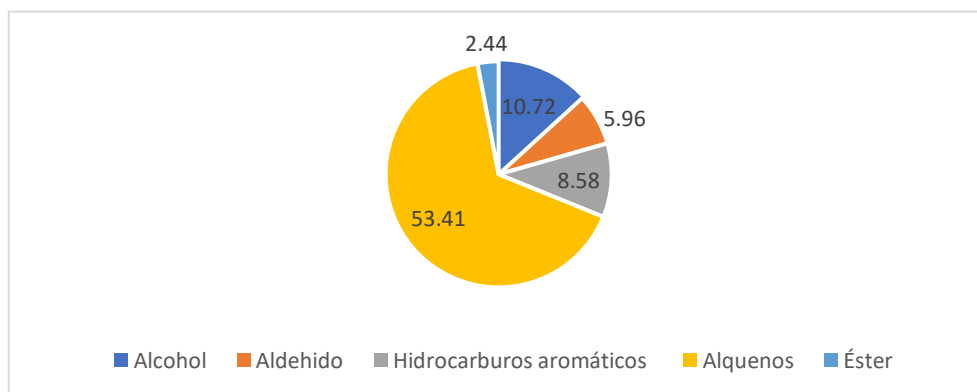


Figura 17: Hidrocarburos presentes en el AE.

En las Figuras del 19 al 23 se muestran las cinco estructuras de las moléculas más abundantes en el aceite esencial.

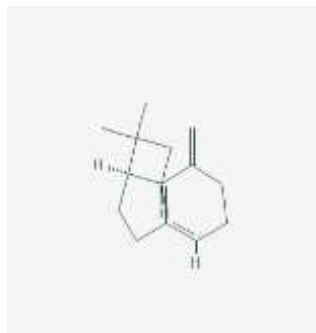
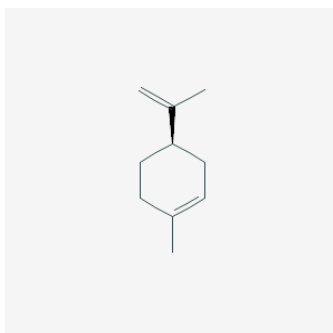
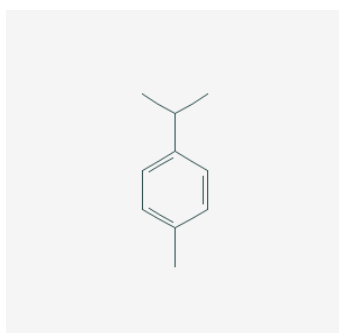

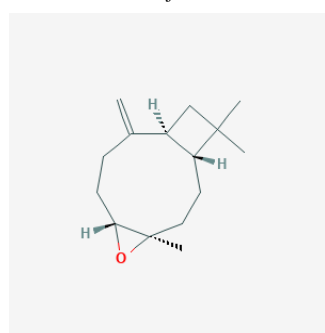
<p>Figura 18 Molécula β-cariofileno</p>  <p>Fuente. NCBI</p>	<p>Figura 19 Molécula de Limonelo</p>  <p>Fuente. NCBI.</p>	<p>Figura 20 Molécula de <i>p</i>-cimeno</p>  <p>Fuente. NCBI.</p>
<p>Figura 21 Molécula de Sabineno</p>  <p>Fuente. NCBI</p>	<p>Figura 22 Molécula de Oxido de cariofileno</p>  <p>Fuente. NCBI</p>	

Figura 23: Espectros de masa de los componentes mayoritarios.

Las fragmentaciones obtenidas, los dos componentes mayoritarios, fueron comparados adicionalmente con información del libro *identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. (Adams, 2017).

4.5.6.4. β -Cariofileno

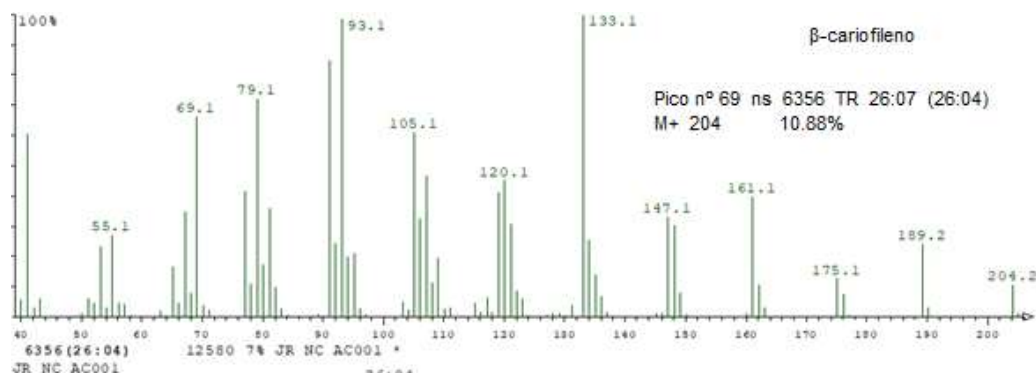


Figura 24: fragmentación de β -cariofileno obtenido con el GS-MS.

En la **Figura 25** se muestra la fragmentación obtenida en el GS-MS del β -Cariofileno uno de los componentes mayoritarios en el aceite esencial.

El β - cariofileno es un compuesto vegetal, miembro del Sesquiterpenos bicíclico, en la **Figura 26** se muestra estructura química del β - cariofileno. En la naturaleza se presenta principalmente como trans - cariofileno mezclado con pequeñas cantidades de sus isómeros, (Z) - β - cariofileno (iso - cariofileno) y α - humuleno. (Fidyt *et. al*, 2016)

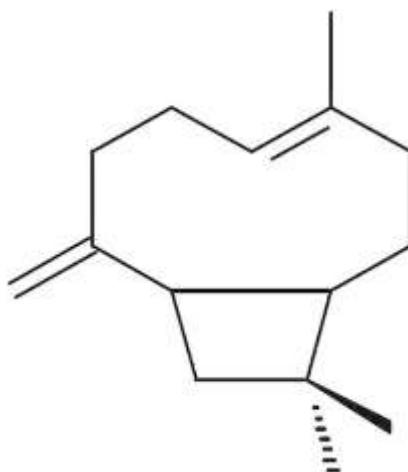


Figura 25: Estructura química del β -cariofileno (4,11,11-trimetil-8-metilen-biciclo [7.2.0] undec-4-eno).

Los Sesquiterpenos bicíclico naturales, el β - cariofileno y el β -óxido de cariofileno están presentes en una gran cantidad de plantas en todo el mundo. estos 2 compuestos poseen importantes actividades anticancerígenas, que afectan el crecimiento y la proliferación de numerosas células cancerosas. Sin embargo, sus efectos antineoplásicos apenas han investigado in vivo. (Fidyt *et. al*, 2016), además actualmente β -Cariofileno es uno de los productos naturales especialmente utilizado en las fitoterapias y cosméticos.

4.5.6.5. Limoneno.

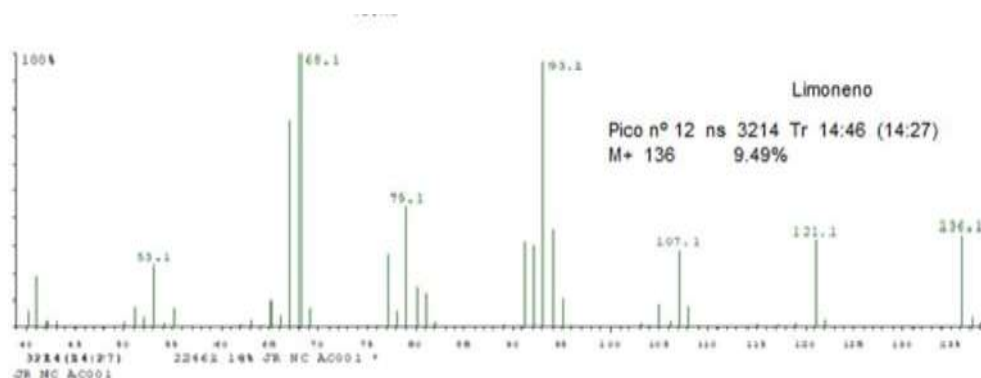


Figura 26: Fragmentación de limoneno obtenido en el GS-MS.

El limonelo es uno de los componentes más abundantes en el aceite esencial de las *Aloysias* (entre un 7 -11%) en la Figura 27 se muestra la fragmentación de obtenida de este compuesto, al ser un Monoterpenos de fórmula $C_{10}H_{16}$, presenta dos isómeros como se muestra en la figura 28, el S-(-)-limoneno y el R-(+)-limoneno. El limoneno es de gran importancia en la industria, se emplea en la producción carvona y p-cimeno, se usa como disolvente de resinas, en la fabricación de adhesivos y tintas. (Masuda *et. al*, 2002).

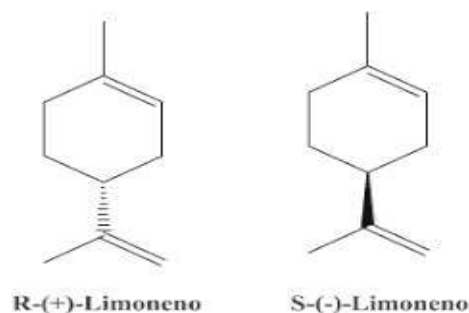


Figura 27: Isómeros ópticos del limoneno.

Algunos otros estudios sugieren que el limoneno posee propiedades antibacterianas , antiespasmódicas, expectorantes y anticancerígenas (Masuda *et. al*, 2002).

4.5.6.6. Otros componentes presentes en el aceite esencial

Otros tres componentes presentes en los aceites esenciales de *Aloysias* que poseen alguna actividad biológica :

- P-cimeno
- Oxido de cariofileno
- Sabineno

Es evidente que al comparar la composición de aceite esencial de “lima-lima” Figura 29 con un grupo de *Aloysias* muestra similitudes. Estos 5 compuestos mayoritarios son componentes químico taxonómicos. En el primer caso todas poseen β -cariofileno en menor o mayor porcentaje, en la *Aloysia Peruviana* posee un 11 % un porcentaje por mucho superior frente otras a *Aloysias* citadas que solo poseen un rango de abundancia de 1% a 6%. Algo resaltante también resulta la cantidad limonero presente en AE de un 9.49% en la *Aloysia Peruviana*. Las demás muestras de AE poseen un porcentaje que va desde un 3% hasta un 21 %. Al comparar los otros componentes como p-cimeno, Oxido de cariofileno y sabineno pueden incluso estar ausentes en los aceites esenciales de las *Aloysias* citadas.(Hashemi *et. al*, 2018, Rojas *et. al*, 2010, Bailac *et. al*, 1999, Bellakhdar *et. al*, 1994).

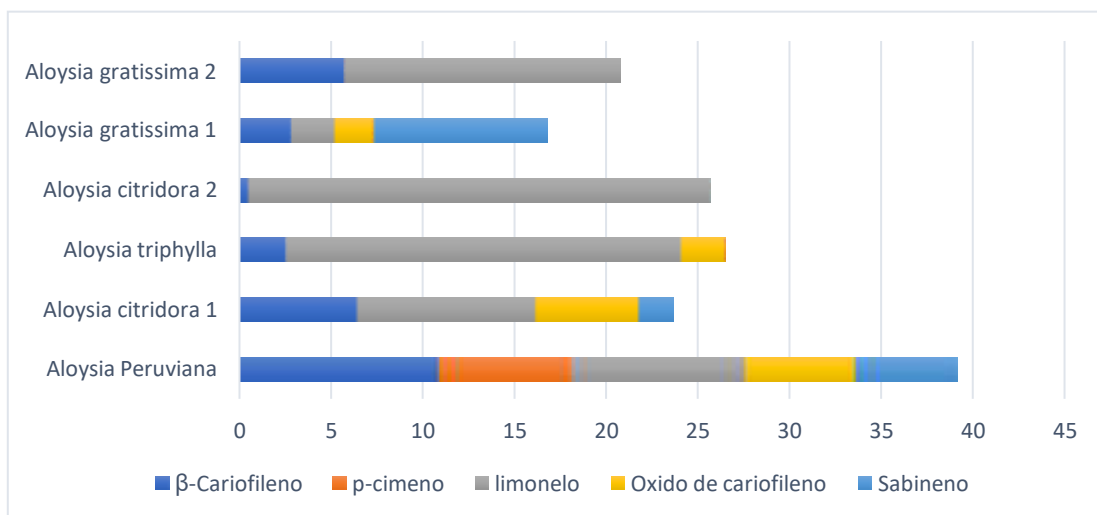


Figura 28: Composición de otras Aloysias.

Es resaltante al separar solo los 2 compuestos como se muestra en la figura 30 el limonelo es representativo en el todas muestras y el *β-cariofileno* es el más resaltante de entre todo el grupo de comparación resulta se ser el de más alto porcentaje.(Hashemi et. al, 2018, Rojas et. al, 2010, Bailac et. al, 1999, Bellakhdar et. al, 1994).

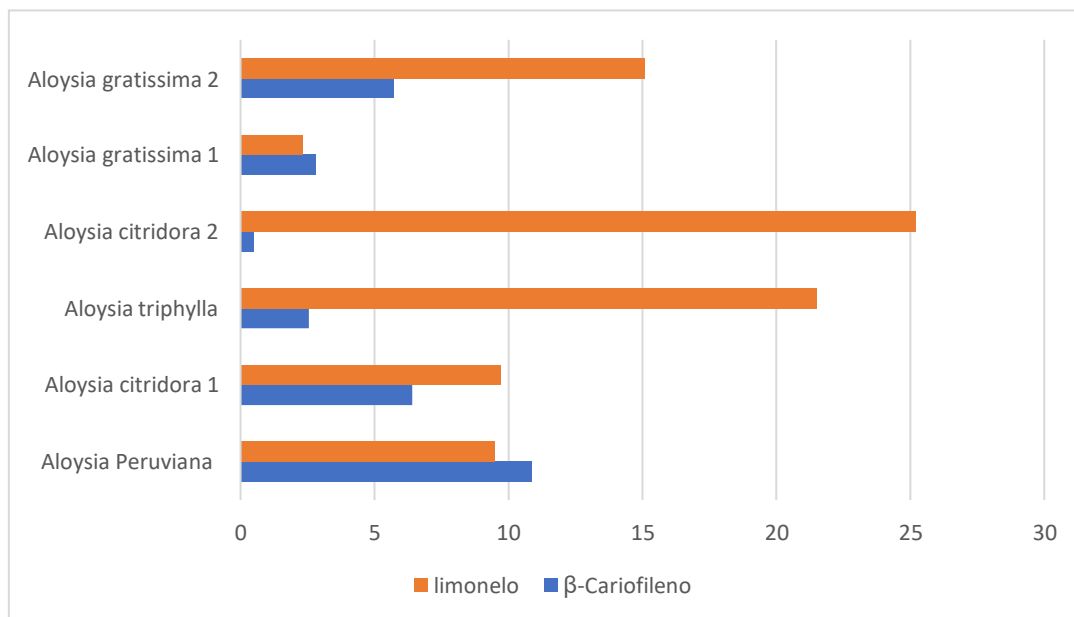


Figura 29: Comparación de Limonelo y B. cariofileno en otras Aloysias.

4.6. Actividad antibacteriana

En la tabla 16 se evidencia que para la muestra existe halo de inhibición solo para *Staphylococcus aureus*, no existe halos de inhibición para *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Se confirma que el aceite esencial tiene actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) pero no tiene ninguna actividad antimicrobiana contra *Escherichia Coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativos) y *Candida albicans* (hongo).

Tabla 16: actividad antibacteriana del aceite esencial de la *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke contra cepas de referencia

Cepa de microorganismo	Diámetro de halos de inhibición (mm)				
	Fluconazol	Gentamicina	Suero fisiológico	Muestra 1	Muestra 2
	(control +)	(control +)	(Control -)		
<i>Escherichia Coli</i>	---	30	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	---	25	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	---	26	0	19	19
<i>Candida albicans</i>	23	---	0	0	0

Al analizar su actividad frente al *Staphylococcus aureus*, se evidencia que 100 ug muestra (crema), resultan en un halo de inhibición de 19 mm otorgándole su porcentaje de efectividad de 73.08. Al ser comparado con el halo de inhibición obtenido es de 26mm obtenido con la Gentamicina. Los resultados que se obtuvieron al realizar las dos repeticiones se visualizan en la **figura 31**.

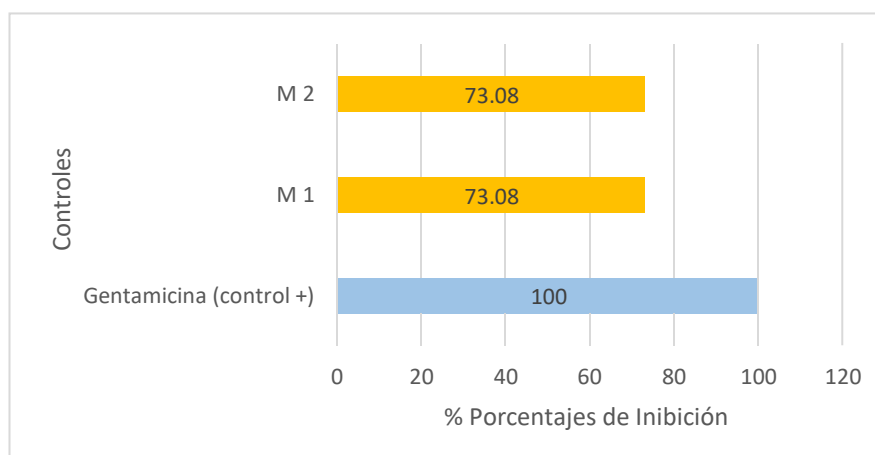


Figura 30: Porcentaje de inhibición de AE comparado con la gentamicina.

De acuerdo con los resultados se propone que el AE, pueden ser considerado como potencial compuesto bioactivo y se evidencian propiedades antibacterianas frente a la cepas *S. aureus*. Es preciso indicar que las pruebas fueron realizadas con cepas clínicas, las cuales son diferentes a las cepas estándar (ATCC). Las cepas clínicas pueden ser mucho más resistentes a comparación de las cepas estándar, pero realizar el ensayo con cepas clínicas se acerca a la realidad si se tiene previsto aplicar el aceite en algún producto.

En los valores obtenidos se observa que el aceite esencial de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke no presento actividad que otras especies de *Aloysia* de su misma familia. Diversos estudios indican que sí son bioactivos frente a *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia Coli* (Aliaga *et. al*, 1999, Demo *et. al*, 2005, Duarte *et, al*. 2006 y 2007). Esta diferencia en la actividad antibacteriana puede ser atribuida a la variación en la composición química del aceite esencial, la ausencia del geranial y el porcentaje mínimo de neral el cual en el caso del aceite esencial de lima - lima no supera el 3%. Otro factor para tomar en cuenta es la proporción de Monoterpenos y Sesquiterpenos es muy cercana no mayor al 7.87 % algo que se pudo evidenciar en la Tabla 14. Finalmente, esta composición podría estar influenciada también por la

ubicación geográfica y el hábitat en la cual crece la planta. Algo ya demostrado en estudios previos de otras especies de *Aloysias*. (Hashemi et. al, 2018, Rojas et. al, 2010, Bailac et. al, 1999, Bellakhdar et. al, 1994).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

El porcentaje de extracción del aceite esencial de *A. aloysioides* Loes & Moldenke obtenido por el método de destilación por arrastre con vapor de agua fue de un RAE% de 0,38. El análisis fisicoquímico del aceite esencial, nos revela que es un líquido cristalino de color ligeramente amarillo, con olor cítrico herbáceo, de sabor ligeramente dulce y cítrico, soluble en alcohol al 96%, posee un índice de refracción igual a 1.4798, con densidad de 0,8561 g/mL. Estos datos indicarían la presencia de hidrocarburos terpénicos. La *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, demostró según la marcha fitoquímica realizada al extracto etanólico que esta contiene: fenoles, taninos y cumarinas.

El aceite esencial de *A. aloysioides* Loes & Moldenke, por Espectroscopía Infrarroja (IR) presenta en su composición moléculas que corresponden a estructuras con grupos funcionales como el carbonilo y metil metileno que son característicos de compuestos aromáticos, cetonas, ésteres y alcoholes.

En la cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas (GC-MS) el aceite esencial de la *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke, se han identificado y cuantificado un total de 208 , donde los compuestos mayoritarios son seis: β -Cariofileno (10.88 %), limonelo (9.9 %), p-cimeno (7,22%), Oxido de cariofileno (5.98 %), Nerolidol (4.96 %) y α -humuleno (4.92 %). La composición química del aceite esencial de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke difiere a las composiciones de otras Aloysias, ya que esta posee un bajo porcentaje de neral y geranial.

Se comprobó su propiedad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* con hasta un 73% de efectividad y cercano al que ocurre con la gentamicina por estas razones podría ser usado en

preparaciones farmacéuticas y aplicaciones en la industria Alimentaria para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*.

Finalmente, esta investigación es el primer reporte de extracción de aceite esencial y de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *A. aloysioides* Loes & Moldenke contra patógenos.

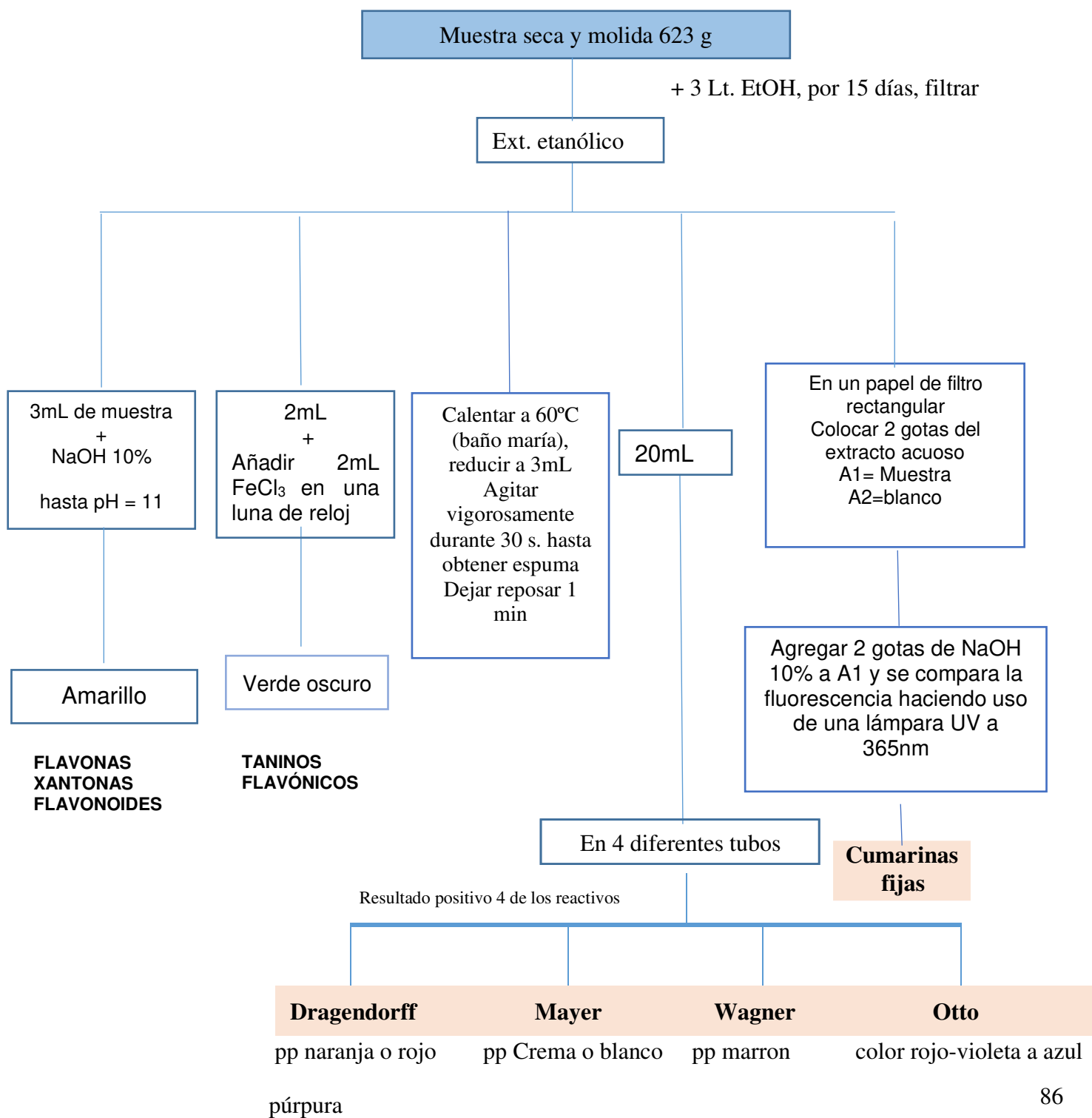
Recomendaciones

- Sería interesante realizar muestreos en las etapas antes, durante y post floración, para identificar en que época podría obtenerse una mejor calidad o mayor cantidad de aceite Esencial.
- Mejorar la temperatura de enfriamiento en el condensador del equipo de arrastre de vapor o en caso contrario considerar otros métodos de extracción para obtener un mayor RAE %.
- Continuar estudios del extracto Etanólico, ya que la identificación cualitativa indica una alta presencia de cumarinas.
- Realizar más estudios con otras cepas microbianas

CAPITULO VI

ANEXOS

Anexo 1: Marcha fitoquímica en Extracto Etanolico.



Anexo 2: Identificación taxonómica de la *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke.

Figura 31: Documento entregado por el museo de Historia Natural.

  UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
 MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

CONSTANCIA N° 124-USM-2019

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta estéril) recibida de **Carmen Rosa Huanca Miranda**, estudiante de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Aloysia Aloysioides* Loes & Moldenke** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: VERBENACEAE

GENERO: *Aloysia*

ESPECIE: *Aloysia Aloysioides* Loes & Moldenke

Nombre vulgar: "Lima, lima"
Determinado por: Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 06 de mayo de 2019

 
M^{ra}. Asunción A. Cano Echevarría
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddo-

Anexo 3: Pruebas cualitativas principales para la determinación de metabolitos secundarios.



Figura 32: Muestra pulverizada.



Figura 33: Equipo utilizado en la molienda.



Figura 35: Extracto Etanolico.

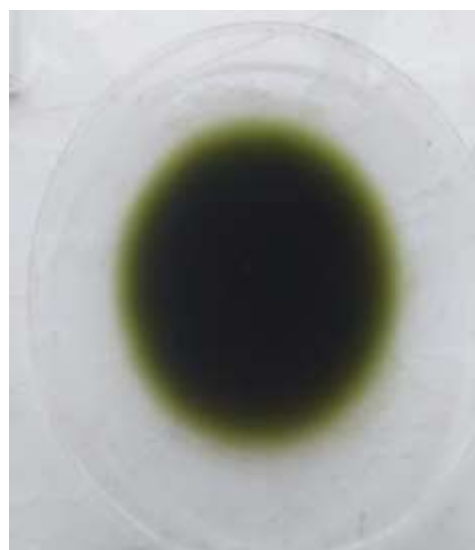


Figura 34: Identificación de Taninos Flavónicos.



Figura 36: Identificación de Flavonas, Xantonas y Flavonoides.

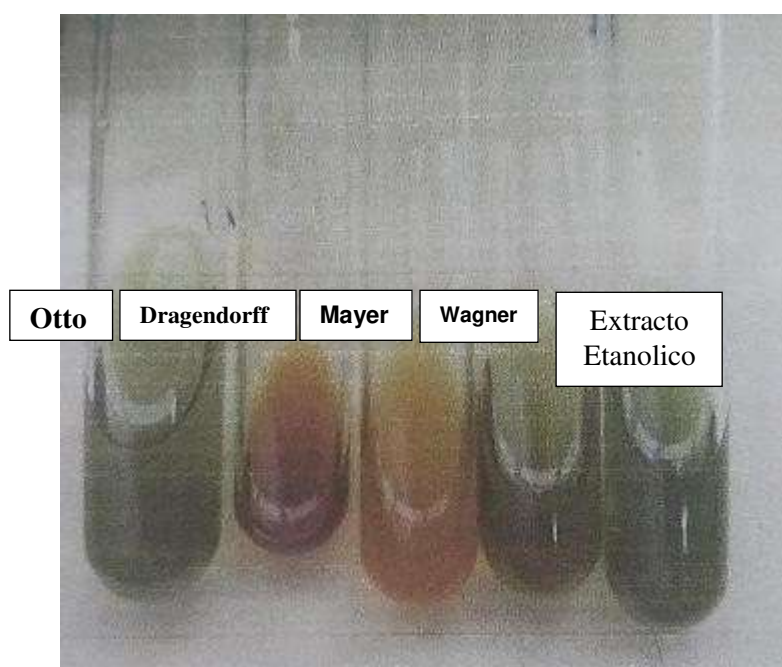


Figura 37: Identificación de Alcaloides.

Anexo 3: Extracción Aceite esencial del aceite esencial de *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenke “lima”.

Figura 38: Equipo semiindustrial de Extracción por arrastre de vapor.



Figura 39: Recepción en tubo de florentino del AE.



Figura 41: 1ra Medición Índice de refracción.



Figura 42: 2da Medición Índice de refracción.



CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Adams R. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4a Edición, Editorial Carol Stream: Allured publishing.
- Aguado M., Nuñez M., Bela J., Okulik N. y Bregni C (2013). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold.(Verbenaceae). Rev Mex Cienc Farm.44(3),48-51.
- Aliaga p.(2013). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hojas de *Aloysia Triphylla* P. “Cedrón “ frente a *Escherichia Coli* ATTC 25922 Y *Staphylococcus aureus* 25923, (Tesis de pregrado). Universidad nacional Jorge Basadre Grohmann
- Al Di Cara, J. (1983). Essential oils. En J. J. McKetta, Encyclopedia of chemical Processing and Design.
- Armijo J., Vicuña E., Romero P., Otiniano, Condorhuaman C. y Hilario B. Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre de vapor . Rev. Per. Quím. Ing. Quím,15(2), 19-27.
- Arteaga M., Bach H. y Garrote L.(2016) .Generación del rendimiento y composición química de aceite esencial en cedrón (*aloesia citrodora palau*).I Jornadas Nacionales de plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales, 32(2)
- Arteaga A. (1980). Estudio comparativo de tres métodos de extracción de aceite esencial de limón sutil (*Citrus aurantifolia*). (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina-UNMLM

- Bailac P, Dellacasa D, Firpo N, Ponzi M. (1999). Composición del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Aloysia gratissima* de San Luis – Argentina. An. Asoc. Quím. Argent,87(3),149-153.
- Bandeira G,Sander M., Dos Santos J, Garrido J, Heinzmann B,Otomar B, Baldisserotto B,Gil L (2017).Lippia alba and Aloysia triphylla essential oils are anxiolytic without inducing aversiveness in fish. *Aquaculture*,482,49-58.
- Bandoni A. (2003). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica :su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores.2ª Edición . Editorial Buenos Aires.
- Bardales M. y Farfan M. (2018). Determinación de los componentes mayoritarios del aceite esencial del cedrón (*Aloysia triphylla*) mediante destilación por arrastre de vapor (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Callao
- Bakkali, F; Averbeck, S; Averbeck, D; Idaomar; M.(2008). Biological effects of essential oils – A review. Science Direct. Food and chemical toxicology,46(2),446-475.
- Bellakhdar J, Indrissi A., Canigual S., Iglesias J y Vila R.(1004). Composición del aceite de hierbaluisa (*Aloysia triphylla* (L`Herit) Briton) de Marruecos. J. Essential Oil,6(5),523 – 526.
- Bravo M y Jiménez G (2021). Estimación del periodo de conservación de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de compuestos fenólicos. (Tesis de pregrado). Universidad De Cuenca.
- Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos [INTERNET].USA :FDA;2019 p. 1. Recuperado de : <https://www.fda.gov/food/recalls-outbreaks-emergencies/outbreaks-foodborne-illness>

- Cano, C., Bonilla, P. y Roque, M. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev. Perú. med. exp. salud pública*, 25(3), 298-301.
- Cervantes, E., García, R., y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 61(1), 28–40.
- Castaño, M. (2012). Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*) sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Chévez Z. (2018). Efecto del pH en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza blanca contra microorganismos de interés en alimentos. (Tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.
- Comunicado de la FDA sobre la seguridad de los medicamentos: La FDA aconseja restringir el uso de antibióticos a base de fluoroquinolonas para ciertas infecciones sin complicaciones; advierte sobre efectos secundarios discapacitantes que pueden presentar [INTERNET]. USA: FDA; 2018 p 1. Recuperado de : <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/comunicado-de-la-fda-sobre-la-seguridad-de-los-medicamentos-la-fda-aconseja-restringir-el-uso-d>
- Costa da Silva A., De Souza P., Carvalho A., Marques W. y Pereira J. (2014).). Los aceites esenciales de *Hyptis Marrubioides*, *Aloysia Gratissima* y *Cordia verbenácea* reducen el avance de la soja asiática *Acta Scientiarum. Agronomy*. 32(2), 159-166.
- Crop & Food Research. (2001). Essential oils and their production (en línea). New Zealand Institute for Crop & Food Research Institute (39). Recuperado de :

<http://www.crop.cri.nz/home/products/services/publications/broadsheets/039essentialoils.pdf>

- Davies N.(1990).Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. J. Chromatogr., 1990;503: 1-24.
- Darwish R., Hammoda H., Ghareeb D., Addelhamid A., Bellah E., Naggar E., Harraz F. y Shawky E.(2020) Discriminación dirigida a la eficacia de los aceites esenciales de tres especies de Juniperus en función de sus actividades antimicrobianas y antiinflamatorias in vitro. Journal of Ethnopharmacology, 112971. doi:10.1016/j.jep.2020.112971
- Demo M., Oliva M., López M. Zunino M. y Zygadlo J. (2005). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas de Argentina. Pharmaceut Biol. 43 (2): 129-134.
- Domínguez X. (1973). Métodos de investigación de fitoquímica .Centro Regional de Ayuda técnica .agencia de desarrollo internacional (AID).MX. Ed. Limusa
- Duarte M. (2006). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales y aromáticas utilizadas en Brasil. Multiciência: Revista Interdisciplinaria de los Centros y Núcleos de la Unicamp , Recuperado de : http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.
- Duarte M., Leme E., Delarmelina C., Soares A., Figueira G. y Sartoratto A.(1997). Actividad de los aceites esenciales de plantas medicinales brasileñas sobre Escherichia coli. Journal Ethenopharmacol.111(2),197-201
- Ekundayo O,Laakso I,Holopainen M,Hiltunen R,Oguntimein Ry Kauppinen V (1990).The Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Oil of Vitex agnus-castus L. Journal of Essential Oil Research, 2(3),115-119,
- Essential oils — Evaluation of miscibility in ethanol [Internet]. INTERNATIONAL STANDARD. 1999. Recuperado de :

<https://cdn.standards.iteh.ai/samples/25312/4e063f07590a4638b657e08d88020c76/ISO-875-1999.pdf>

- Fang L, Wolmarans B, Kang M, Jeong K, Wright A. (2015). Application of Chitosan Microparticles for Reduction of *Vibrio* Species in Seawater and Live Oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol*, 81(2), 640–647.
- Fidyt K., Fieddorowicz a., Strzadala L. y Antoni A. (2016) β - cariofileno y β - óxido de cariofileno: compuestos naturales con propiedades anticancerígenas y analgésicas. *Cancer Medicine*, 5(10), 3007-3017.
- Fransina E., Tanasale M., Latupeirissa J., Malle D., Tahapary R. y Cribado A. (2019) Fitoquímico del extracto acuoso de corteza de gayam (*Inocarpus edulis*) y su ensayo de actividad inhibidora de amilasa. *Conf. Series: Materials Science and Engineering* 509 012074 doi:10.1088/1757-899X/509/1/012074.
- Fuente de la fábrica Vitex agnus-castus para la venta [Internet]. Alibaba. 2021 [citado 10 enero 2021]. Recuperado de : <https://spanish.alibaba.com/product-detail/factory-supply-vitex-agnus-castus-oil-for-sale-60076515166.html>
- Fundación Para La Innovación Agraria Del Gobierno De Chile (2003). Boletín de planta medicinales y aromáticas (en línea) , 8. Recuperado de : <http://www.fia.cl/tag/colombia/>
- Fun C. & Baerheim A. (1990). The Essential Oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., *Journal of Essential Oil Research*, 2(5), 265-267.
- Gallegos-Zurita M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med.*, 77(4), 327-32.
- García J. (2017). Extracción de aceite esencial por fluidos supercríticos y arrastre con vapor de cedrón (*Aloysia triphylla*) en la región Arequipa. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

- Girón J. (2012) Reutilización de la salmuera en la etapa de salado del beneficio artesanal del maní (*Arachis Hypogae L.*) y cuantificación de contenido tánico en la testa-episperma de la semilla. (tesis de pregrado) universidad de San Carlos de Guatemala.
- Hashemi S, Mohammad B, Khaneghah A, Koubaa M, Barba F, Abedi E, Niakousari M, Tavakoli J.(2018). Extracción de aceite esencial de hojas de *Aloysia citriodora* Palau usando ultrasonido continuo y pulsado: cinética, actividad antioxidante y antimicrobiana. *Process Biochemistry*,65,197-204.
- Heywood V. (1985). Las plantas con flores .Editorial Reverte .España 329 pp.
- Hidalgo G. y Romero A. (2016). Diseño de una planta piloto para la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor (Tesis de pregrado). Universidad De Piura
- Huamán J., Tomás T. y Castro N. (2019). Guía de prácticas de laboratorio de productos naturales, Facultad De Química E Ing. Química, Escuela Académica Profesional De Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Jaimes L. y Hoyos J. (2020). Plantas medicinales de la familia Verbenaceae con potencial antifúngico contra hongos levaduriformes (títulos de pregrado). Universidad De La Salle;
- Kuma E.(200). Destilación de aceites esenciales .Cadena Alimentaria .Revista para el procesamiento de alimentos a pequeña escala .National Lottery Charities Board. ITDG ,5(5), 8-11.
- Lao c., Iglesias m. y Rodríguez R. (2006). Introducción a las técnicas analíticas aplicadas a la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos y elementos químicos presentes en el medio ambiente . instituto Geológico y Minero de España .Recuperado de :

https://www.researchgate.net/profile/Roberto_Lorenzo_Pacheco/publication/263747238_Introduccion_a_las_tecnicas_analiticas_aplicadas_a_la_determinacion_cualitativa_y_cuantitativa_de_compuestos_y_elementos_quimicos_presentes_en_el_medio_ambiente/links/00463

- Linde, G., Colauto, N., Alberto, E. y Gazim, Z.(2016).Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de Lippia alba.Rev. Bras. Pl. Med., Campinas,18(1),191-200.
- Look de Ugaz, O. (1994). Investigación fitoquímica , métodos en el estudio de productos naturales. Segunda edición . Fondo editorial
- López-Villafranco M, Aguilar-Contreras A, Aguilar-Rodríguez S, Xolalpa-Molina S.(2017).Las Verbenaceae empleadas como recurso herbolario en México: una revisión Etnobotánica-Médica. Polibotánica.44:195-216.
- Loyola, N., López, R. y Acuña, C.(2008). Evaluación sensorial y analítica de la calidad de aceite de oliva extravirgen. Chile: IDESIA
- Martínez , A., (2003) Aceites Esenciales . Facultad Química Farmacéutica Medellín
- Molero, C., Camino S. y Alonso, V. (2006). Química física para ingenieros, primera edición, Valencia : Servie de Publicacions
- Morón Rodríguez FJ. (2008). La biodiversidad y las plantas medicinales en riesgo. Rev cubana Plant Med.,13(3), ISSN 1028-4796.
- Muñoz P. (2016). Guía de Laboratorio de química ingeniería forestal-régimen anual, Laboratorio de Polímeros Departamento de Química, Universidad de los andes Mérida Venezuela, [internet] disponible en: <http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/fidelmun/practica8aa.pdf>.

- National center for biotechnology information . (2021). Sabineno. Recuperado de :<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- National center for biotechnology information . (2021). Beta-cariofileno. Recuperado de :<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- National center for biotechnology information. (2021).oxido de cariofileno. Recuperado de :<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- National center for biotechnology information. (2021). P-cimeno. Recuperado de :<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- National center for biotechnology information. (2021). limonene. Recuperado de :<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- No time to wait securing the future from drug resistant infections [INTERNET] USA,Informe Para El Secretario General De Las Naciones Unidas;2019 P.28. Disponible en: www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-es.pdf?sfvrsn=5b424d7_
- Norma Técnica Peruana, NTP 319.079:1974 (revisada el 2016) aceites esenciales. Extracción de muestras. 1a. Edición.
- Norma técnica Peruana , NPT 319.081: 1974. Aceites esenciales : Determinación de la densidad Y densidad relativa
- Norma técnica Peruana , NPT 319.075: 1974. Aceites esenciales: Determinación del Índice de refracción.
- Palomino, O. (2001). Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Madrid: Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).

- Pereira, C y Meireles, A. (2007). Evaluación del rendimiento global, composición, actividad antioxidante y costo de fabricación de extractos de limón verbena (*aloesia trifhylla*[l'hérit.] britton) y mango (*mangifera indic.*). J FOOD PROCESS ENG., 30,150-173.
- Pérez-Zamora, C., Torres C., Aguado, M., Bela, A., Núñez, M. y Bregni, C. (2016). Antibacterial activity of essential oils of *Aloysia polystachya* and *Lippia turbinata* (Verbenaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas,15(4),199 – 205.
- Peredo, L, Palou, E. y López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. Tema selectos de ingenierías de alimentos,3(1),24-32.
- Picaso J. (2000) métodos básicos para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica.
- Pino J., Ortega L., Rosado A., Rodríguez J. y Baluja R. (1998). Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Rev Cubana Farm . ,30(1),29-35.
- Ramírez A., Luz S.; Díaz B. y Hilda E. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*) Scientia Et Technica, 8(33),397-400.
- Rojas J, Ronceros S, Palacios O, Sevilla C. (2012). Efecto anti-*Trypanosoma cruzi* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (hierba luisa) en ratones Balb/c. An. Fac. med., 73(1), 7-12.
- Rojas L,Velasco J,Díaz T, Gil Otaiza R,Carmona J,Usabillaga A.(2010).Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton contra patógenos genito-urinarios. BLACPMA,9 (1),56 – 62.
- Rengifo R. (2013). Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. Revista Farmaciencia,1(2),51-56

- Rico F, Gutiérrez C, Díaz C. (2015). Influence of chitosan coatings with citric essential oil on the shelf-life of minimally processed mango (*Mangifera indica* L.). *Rev. Fac. Nac. Agron*,68(2),7679-7688.
- Ricco, R., Marcelo, L., Portman, E., Riedes C., Llesuy, S., Gurni, A. y Carballo, A. (2010). Análisis de polifenoles , actividad antioxidante y genotoxicidad en especies de *Lippia* y *Aloysias*(Verbenácea).*Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 9(5),388-396.
- Rodríguez, Y., Valdés, M., Hernández, H. y Soria, S. (2019).Guía metodológica para estudio etnobotánico de especies forestales en comunidades amazónicas y afines.*Revista cubana de Ciencias forestales*.7(1),98-110.
- Shafiee F., Moghadamnia A., Shahandeh Z., Sadighian F. y Khodadadi E.(2016). Evaluación de los efectos antibacterianos de extractos de hojas acuosos y etanólicos de *Aloysia Citriodora* (Lemon verbena) sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, *Médico de electrones*.8 (12): 3363–3368.
- Seham S, El-Hawary M. Amira Y, Motaal A, Abd-Hameed L. (2012). Bioactividad, compuestos fenólicos y propagación in vitro de *Lippia citriodora* Kunth cultivada en Egipto, *B-FOPCU*,50, 1–6.
- Skoog, D. A., Holler, J., & Crouch, S. (2018). *Principios de Análisis Instrumental* (6.^a ed.). Cengage Learning.
- SENA .Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Recuperado de : <http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/ACEITES_ESENCIALES_EXTRAIDOS_DE_PLANTAS_MEDICINALES_Y_AROMATICAS.pdf>.

- Senatore F. Napolitano F. and Ozcan M. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from fruits of *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) growing in Turkey. *Jeobp* , 6 (3), 185-190.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2014). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (7.a ed.). Wiley.
- Sotelo-Boyás, E., Valverde-Aguilar, G., Plascencia-Jatomea, M., Correa-pacheco, N., Jiménez-Aparicio, A., Solorza-Feria, J., Barrera-Necha, L. y Bautista-Barrios, S. (2015). Caracterización de nanopartículas de quitosano adicionadas con aceites esenciales. Efecto in vitro sobre *Pectobacterium carotovorum*. *Revista Mexicana de Ingeniería química* , 14(3), 589-599.
- Steibel, E. (2000) Las Verbenáceas (Verbenaceae J. St.-Hil.) de la Provincia de La Pampa, Argentina. *Rev. Fac. Agronomía – UNLPam*, 11 (1).
- Stashenko E. y Martínez J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*. 1(3), 29-45.
- Stashenko E. y Martínez J. (2010). Algunos aspectos básicos para identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
- Stashenko E. y Martínez J. (2019). Estudio de aceites esenciales obtenidos de plantas tropicales cultivadas en Colombia, Aceites esenciales – Aceites de la naturaleza [Título provisional], 10.5772 / intechopen.77673.
- Stashenko, Elena E. (2009b). Aceites esenciales. UIS-CENIVAM. Bucaramanga, Colombia. 180 pp.
- Stashenko, E., Martínez, J., Durán D., Córdoba, Y. y Caballero. D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites

esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) Cultivadas en Colombia
 Rev. Acad. Colomb. Cienc., 38,89-105.

- Suksamrarn A., erawattanametin K., Brophy J.(1991).Variation of Essential Oil Constituents in *Vitex trifolia* Species Flavour And Fragrance Journal,6,97-99.
- Teixeira, M., Leme, E., Delarmelina, C., Almeida, A., Figueira, G. y Sartoratto, A., (2007). Activity of essential oils from brazilian medicinal plant of *Escherichia Coli*.Journal of Ethnopharmacology 111,197-201.
- Trovati, G., Gilberto, O., Sanchez, E. y Galhiane, M.(2010).Essential Oil Composition of *Aloysia gratissima* From Brazil. J ESSENT OIL RES,4,325-326.
- Tucker, A., Maciarelo, M., Espaillet, J. y French, E.(1993).The Essential Oil of *Lippia micromera* Schauer in DC. (Verbenaceae) J. Essent. Oil Res.,5,683-685.
- Valderrama, N., Algecira, N. y Albarracín, W.(2016).Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero. Materia,21(01),141 – 156.
- Vandresen, F., Shmitt, E., Kato, L., Alves De Oliveira, C., Bersani, A. y Da Silva, C.(2010). Constituyentes químicos y evaluación de la actividad antibacteriana y antiedematógena de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. y *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. Revista Brasileña Farmacogn,20(3),317-321.
- Vázquez-Briones M, Guerrero-Beltrán J.(2017).Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre propiedades fisicoquímicas en películas de quitosano. Scientia Agropecuaria, 8(4),401 – 409.
- Verde, A., Fajardo, J., Valdez, A., Roldan, R. y Garcia, J.(2012). Etnobotánica y biodiversidad metodología de trabajo para la recuperación del conocimiento tradicional de los recursos naturales .X Congreso de sociedad de Española de agricultura ecología

S.I.: pp. 27 Recuperado de : <https://www.agroecologia.net/wp-content/uploads/intranet/2013/03/28-etnobotanica-fajardo.pdf>

- Wernert. M., Wagner, M., Gurni A., Carballo, M., y Ricco, R.(2009).Estudio de polifenoles de infusiones y conocimientos de hojas de “Cedrón” (*Aloysia citridora* Palau) y “Poleo” (*Lippia Turbinata* Griseb)- Verbenaceae. BLACPMA;8(4): 308-311.
- Wenzel, R., Reagan D., Bertino, J. Jr., Baron E.y Arias K. (1998). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and management guidelines. *Am J Infect Control*,26(2),102-10.
- Willmann, D., Schmidt, M., Heinrich, M. y Rimpler, H.(2000). Verbenaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. México, DF: 27 Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Young, G. (2003). *Essential Oils: Integrative Medical Guide*, Essential Science Publishing, 3rd edition.
- Zygodlo J, Lamarque A, Guzman C. & Grosso N. (1995). Composición de los aceites florales de algunas especies de *Lippia* y *Aloysia* de Argentina, *Journal of essential oil Research* ,2(6),593-595.